

**Veränderungen im Transkriptom  
und Chromatin  
bei der Festlegung  
von Gründerzellen im *Arabidopsis thaliana*  
Infloreszenzmeristem**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln  
vorgelegt von  
Anneke Frerichs  
aus Bonn

**Veränderungen im Transkriptom  
und Chromatin  
bei der Festlegung  
von Gründerzellen im *Arabidopsis thaliana*  
Infloreszenzmeristem**

Inaugural-Dissertation  
zur  
Erlangung des Doktorgrades  
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät  
der Universität zu Köln  
vorgelegt von  
  
Anneke Frerichs  
  
aus Bonn

Berichterstatter/in: Prof. Dr. Wolfgang Werr

Prof. Dr. Ute Höcker

Tag der letzten Prüfung: 10. September 2018

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis.....</b>	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis .....</b>	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis .....</b>	<b>II</b>
<b>Kurzzusammenfassung.....</b>	<b>1</b>
<b>Abstract.....</b>	<b>2</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1.1 Die Modellpflanze <i>Arabidopsis thaliana</i> .....	3
1.2 Das Infloreszenzmeristem von <i>A. thaliana</i> .....	3
1.3 Phytohormone in der Organbildung.....	4
1.4 Festlegung der adaxialen-abaxialen Polarität in Organen .....	6
1.5 Chromatinstruktur und Transkriptionsfaktoren .....	6
1.6 Der Transkriptionsfaktor DORNRÖSCHEN-LIKE .....	7
1.7 Ziel der Doktorarbeit .....	9
<b>2 Material und Methoden .....</b>	<b>11</b>
2.1 Material .....	11
2.1.1 Firmen für Bestellungen von Laborbedarf .....	11
2.1.2 Vektoren .....	11
2.1.3 Antibiotika .....	12
2.1.4 Antikörper .....	12
2.1.5 Medien .....	12
2.1.6 Bakterienstämme .....	13
2.1.7 Kits .....	13
2.1.8 Software .....	13

2.1.9	Pflanzenmaterial .....	14
2.2	Methoden .....	15
2.2.1	Identifikation von konservierten Regionen.....	15
2.2.2	Mikroskopie.....	16
2.2.3	Transformation von <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....	16
2.2.4	Transformation von Pflanzen .....	16
2.2.5	Isolation von Nukleinsäuren.....	17
2.2.6	Reverse Transkription .....	17
2.2.7	Design von Primern .....	17
2.2.8	Polymerase-Kettenreaktion .....	18
2.2.9	Quantitative Echtzeit-PCR .....	18
2.2.10	DNA-Sequenzierung .....	19
2.2.11	Fluoreszenzabhängige Sortierung von Zellen .....	19
2.2.12	Isolation und Sequenzierung des Transkriptoms.....	20
2.2.13	Isolation von spezifisch gebundenen Chromatinregionen .....	20
2.2.14	Genom-weite Sequenzierung von offenem Chromatin .....	22
2.2.15	Bioinformatische Auswertung der Rohdaten von genomweiten Sequenzierungen.....	23
2.2.16	Funktionelle Zuordnung von Genen in ein Gen-Ontologie Netzwerk .....	24
<b>3</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>25</b>
3.1	Sortierung von Zellen anhand ihrer Fluoreszenzemission .....	25
3.2	Genexpression im Sprossapikalmeristem.....	26
3.2.1	Distinkte Transkriptome in verschiedenen Zelltypen .....	27
3.2.2	Überprüfung der RNA-Seq Ergebnisse mittels qPCR sowie der Wirkung des Protoplastierens auf die Genexpression .....	27
3.2.3	Genexpression in GFP+ und GFP– Zellen im Vergleich zum IM .....	29

3.2.4	Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Genexpression von GFP+ und GFP– Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem.....	30
3.2.5	Direkter Vergleich der Genexpression von GFP+ zu GFP– Zellen .....	33
3.2.6	Einordnung von differenziell regulierten Genen in Gen-Ontologie Gruppen....	34
3.2.7	Veränderungen in der Aktivität von Genen der Biosynthese- und Signalwege von Auxin .....	36
3.2.8	Veränderungen in der Expression von Genen des Cytokininsignalweges .....	37
3.3	Identifikation von DRNL Zielgenen .....	39
3.4	Identifizierung von zugänglichen Chromatinregionen .....	40
3.4.1	Größenverteilung der sequenzierten Fragmente .....	40
3.4.2	Effizienz der ATAC-Seq Methode gegenüber DNase-Seq .....	40
3.4.3	Position von THSs in Relation zum Gen.....	41
3.4.4	THSs im <i>DRNL</i> -Promotor und ihre Korrelation mit bekannten Motiven .....	42
3.4.5	Zugänglichkeit des Chromatins im Enhancer 2 und am Transkriptionsstart von <i>DRNL</i> .....	43
3.4.6	Bestätigung der im <i>DRNL</i> -Promotor identifizierten Korrelation von THSs mit bekannten Motiven .....	44
3.4.7	Einordnung der mit THSs korrelierten Gene in funktionelle GO-Gruppen.....	47
3.4.8	Genomweite Korrelation von THSs mit AP1 bzw. SEP3 Bindestellen .....	48
3.5	Korrelation von differenzieller Chromatinzugänglichkeit mit Veränderungen in der Genexpression .....	49
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>51</b>
4.1	Das Transkriptom von Gründer- sowie Infloreszenzmeristemzellen .....	51
4.1.1	Veränderungen in der Genexpression aufgrund von Stress .....	51
4.1.2	Das Transkriptom der Gründerzellen im direkten Vergleich zu den GFP– Zellen.. .....	52
4.1.3	Phytohormonperzeption in den Gründerzellen .....	53
4.2	Identifikation der DRNL Zielgene.....	55

4.3	Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit in den Gründerzellen .....	56
4.3.1	Hohe Sensitivität in der Erkennung von Chromatinstrukturen .....	56
4.3.2	Position der THSs in Relation zu einem Gen .....	57
4.3.3	Chromatinzugänglichkeit von <i>DRNL</i> .....	58
4.3.4	Funktionelle Unterschiede der Gene mit dTHS+ oder dTHS– .....	60
4.3.5	Korrelation von THS sowie dTHS mit Transkriptionsfaktorbindestellen .....	60
4.4	Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit korrelieren mit differenziell regulierter Genexpression .....	62
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick .....</b>	<b>64</b>
<b>6</b>	<b>Literatur .....</b>	<b>66</b>
<b>7</b>	<b>Anhang A .....</b>	<b>81</b>
7.1	Liste der verwendeten Primer .....	81
7.2	GO-Netzwerke von GFP+ und GFP– Zellen im Vergleich zum IM .....	82
7.3	Transkriptmengen der <i>IAA</i> und <i>PIN</i> Gene .....	84
7.4	Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit .....	85
7.5	Korrelation von Veränderungen in der Genexpression mit der Chromatinzugänglichkeit .....	86
<b>8</b>	<b>Anhang B .....</b>	<b>88</b>
8.1	DNA-Sequenzen .....	88
8.2	Gene mit THS bzw. dTHS in Korrelation zu Hoch-, Herunterregulation, AP1 bzw. SEP3 Bindestellen .....	88
	<b>Erklärung .....</b>	<b>89</b>

## Abkürzungsverzeichnis

<b>°C</b>	Grad Celsius	<b>erGFP</b>	Grün Fluoreszierendes Protein mit Signalpeptid für den Transport ins Endoplasmatische Retikulum
<b>µg</b>	Mikrogramm	<b>ETT</b>	ETTIN
<b>µl</b>	Mikroliter	<b>FACS</b>	„Fluorescence-activated cell sorting“
<b>µl</b>	Mikroliter	<b>FC</b>	Verhältnis von Transkriptionsebenen
<b>µm</b>	Mikrometer	<b>FM</b>	florales Meristem
<b>µm</b>	Mikrometer	<b>FPKM</b>	„Fragments Per Kilobase Million“
<b>A. thaliana</b>	Arabidopsis thaliana	<b>g</b>	Gramm
<b>ACT2</b>	ACTIN 2	<b>g</b>	Zentrifugalbeschleunigung
<b>AHP</b>	HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER	<b>gDNA</b>	genomische DNA
<b>AP1</b>	APETALA1	<b>GFP</b>	Grün Fluoreszierendes Protein
<b>ap1cal</b>	apetala1-1 cauliflower-1	<b>GO</b>	Genontologie
<b>ARF</b>	AUXIN RESPONSE FACTOR	<b>GR</b>	Glucocorticoid Rezeptor
<b>ARR</b>	RESPONSE REGULATOR	<b>h</b>	Stunde
<b>ATAC</b>	„Assay for Transposase-Accessible Chromatin“	<b>H3K27me3</b>	dreifach methyliertes Lysin 4 des Histons 3
<b>AuxRE</b>	Auxin responsive Element	<b>H3K4me3</b>	dreifach methyliertes Lysin 27 des Histons 3
<b>bcm1</b>	„B class modifier“	<b>IAA</b>	Indol-3-Essigsäure
<b>BiNGO</b>	Biological Networks Gene Ontology tool	<b>IM</b>	Infloreszenzmeristem
<b>BOP</b>	BLADE ON PETIOLE	<b>IPA</b>	Indol-3-Pyruvat
<b>bp</b>	Basenpaare	<b>KAN</b>	KANADI
<b>BSA</b>	Rinderserumalbumin	<b>kb</b>	Kilobasenpaare
<b>CAL</b>	CAULIFLOWER	<b>l</b>	Liter
<b>cDNA</b>	komplementäre DNA	<b>LB</b>	„lysogeny broth“
<b>ChIP</b>	Chromatin-Immunopräzipitation	<b>LFY</b>	LEAFY
<b>Ct</b>	„cycle threshold“	<b>LRP1</b>	LATERAL ROOT PRIMORDIUM 1
<b>CUC1</b>	CUPSHAPED COTYLEDON 1	<b>M</b>	Molar
<b>CYCB1;1</b>	CYCLIN B1;1	<b>mAm</b>	Milliampere
<b>CYCD1;1</b>	CYCLIN D1;1	<b>MES</b>	2-(N-morpholino)ethanesulfonic acid
<b>ddH<sub>2</sub>O</b>	doppelt destilliertes Wasser	<b>min</b>	Minute
<b>Dex</b>	Dexamethason	<b>ml</b>	Milliliter
<b>DNA</b>	Desoxyribonukleinsäure	<b>mM</b>	Millimolar
<b>DRN</b>	DORNRÖSCHEN	<b>MP</b>	MONOPTEROS
<b>DRNL</b>	DORNRÖSCHEN-LIKE	<b>mRNA</b>	Boten-RNA
<b>dTHS</b>	höhere THS in GFP+ oder GFP– Zellen	<b>NaCl</b>	Natriumchlorid
<b>dTHS+</b>	höhere THS in GFP+ Zellen	<b>ng</b>	Nanogramm
<b>dTHS–</b>	höhere THS in GFP– Zellen	<b>NGS</b>	Next Generation Sequencing
<b>EGS</b>	ethylene glycol bis(succinimidyl succinate)		
<b>En</b>	Enhancer		

<b>NK</b>	Negativ Kontrollproben
<b>nm</b>	Nanometer
<b>OD</b>	Optische Dichte
<b>OLR</b>	offener Leserahmen
<b>PCA</b>	Hauptkomponentenanalyse
<b>PCR</b>	Polymerase-Kettenreaktion
<b>PFI</b>	PFIFFERLING
<b>PHB</b>	PHABULOSA
<b>PHV</b>	PHAVOLUTA
<b>PIN</b>	PIN-FORMED
<b>pPCR</b>	quantitative Echtzeit-PCR
<b>PRS</b>	PRESSED FLOWER
<b>REV</b>	REVOLUTA
<b>RNA</b>	Ribonukleinsäure
<b>rpm</b>	Runden pro Minute
<b>s</b>	Sekunde
<b>SAM</b>	Sprossapikalmeristem
<b>Seq</b>	Sequenzierung
<b>STY1</b>	STYLISH 1
<b>TAA1</b>	TRYPTOPHAN AMINOTRANS- FERASE OF ARABIDOPSIS 1
<b>TBP</b>	TATA-binding Protein
<b>THS</b>	„Transposase Hypersensitive Site“
<b>TIR1/AFB</b>	F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEINS
<b>Trp</b>	Tryptophan
<b>TSS</b>	Transkriptionsstart
<b>TTS</b>	Transkriptionsterminationsstelle
<b>U</b>	Einheit
<b>V</b>	Volt
<b>v/v</b>	Volumen pro Volumen
<b>w/v</b>	Gewicht pro Volumen
<b>YAB</b>	YABBY
<b>YEB</b>	„yeast extract broth“
<b>YUC</b>	YUCCA



## Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> GFP-Transkripte in GFP+ und GFP– Zellen von vier biologischen Replikaten	26
<b>Tabelle 2:</b> Anzahl an differenziell transkribierten, nuklearen Genen in GFP+ bzw. GFP– Zellen im Vergleich zu unprotoplastierten Infloreszenzmeristemzellen	30
<b>Tabelle 3:</b> Anzahl an Genen, die in GFP+ bzw. GFP– im Vergleich zum Infloreszenzmeristem (IM) hoch- bzw. herunter-reguliert sind	30
<b>Tabelle 4:</b> Anzahl an Genen die gemeinsam in GFP+ und GFP– Zellen oder nur in GFP+ bzw. GFP– Zellen gegenüber dem IM differenziell transkribiert werden	31
<b>Tabelle 5:</b> Differenziell transkribierte Gene im Vergleich von GFP+ zu GFP– Zellen	34
<b>Tabelle 6:</b> GO-Gruppen der herunter- und hochregulierten Gene mit der jeweiligen Genanzahl	35
<b>Tabelle 7:</b> Liste der verwendeten Primer	81
<b>Tabelle 8:</b> Anteil an transkribierten bzw. nicht transkribierten Genen bei denen THSs identifiziert werden konnten	86

## Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Infloreszenz in <i>A. thaliana</i> _____	14
<b>Abbildung 2:</b> Zellen des <i>ap1cal</i> Infloreszenzmeristems _____	25
<b>Abbildung 3:</b> Darstellung der mittels FACS Vantage SE sortierten Protoplasten _____	25
<b>Abbildung 4:</b> Hauptkomponentenanalyse der Genexpression _____	27
<b>Abbildung 5:</b> Transkriptmengen nach RNA-seq bzw. qPCR von <i>DRNL</i> , <i>AHP6</i> , <i>HSP70</i> und <i>BP</i> _____	28
<b>Abbildung 6:</b> Transkriptmengen von 14 Genen im Vergleich von RNA-Seq und qPCR _____	28
<b>Abbildung 7:</b> Genexpression in GFP+ und GFP– Zellen im Vergleich zu unprotoplastierten Infloreszenzmeristemzellen _____	29
<b>Abbildung 8:</b> GO-Netzwerk von herunterregulierten Genen in GFP+ oder GFP– Zellen im Vergleich zum Infloreszenzmeristem _____	31
<b>Abbildung 9:</b> GO-Netzwerk von Genen, die nur in GFP+ Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem differenziell transkribiert werden _____	32
<b>Abbildung 10:</b> Transkribierte Gene in GFP+ und GFP– Zellen _____	33
<b>Abbildung 11:</b> Zuordnung der hoch- und herunterregulierten Gene in Gen-Ontologie (GO) Gruppen _____	34
<b>Abbildung 12:</b> Transkriptmengen von Auxinbiosynthese-Genen _____	36
<b>Abbildung 13:</b> Transkriptmengen der 23 <i>ARF</i> ( <i>AUXIN RESPONSE FACTOR</i> )-Gene _____	37
<b>Abbildung 14:</b> Transkriptlevel von <i>HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER</i> ( <i>AHP</i> ) _____	38
<b>Abbildung 15:</b> Transkriptmengen der <i>RESPONSE REGULATOR</i> ( <i>ARR</i> ) _____	38
<b>Abbildung 16:</b> qPCR von ChIP-Proben des <i>ap1cal</i> Infloreszenzmeristems von Pflanzen mit dem Transgen <i>AP1/35S::AP1-GR</i> _____	39
<b>Abbildung 20:</b> Verteilung der ATAC-Seq Fragmente anhand ihrer Größe _____	40
<b>Abbildung 21:</b> Effizienz der ATAC-Seq gegenüber DNase-Seq in der Identifizierung von zugänglichem Chromatin _____	41
<b>Abbildung 22:</b> Genomweite Verteilung von THSs und Histonmodifikationen in Relation zu Transkriptionsstart (TSS) und Transkriptionsterminationsstelle (TTS) eines Gens _____	42
<b>Abbildung 23:</b> Position von THSs im <i>DRNL</i> Promotor und ihre Korrelation mit bekannten Motiven _____	43
<b>Abbildung 24:</b> Schnittstellen der Tn5 Transposase im Enhancer 2 und am Transkriptionsstart von <i>DRNL</i> _____	44

<b>Abbildung 25:</b> THSs und ihre Korrelation mit bekannten Motiven von drei Genen der Blütenentwicklung sowie einem Gen der Zellzykluskontrolle	45
<b>Abbildung 26:</b> THSs und ihre Korrelation mit bekannten Motiven von zwei Haushaltsgenen	46
<b>Abbildung 27:</b> THSs und ihre Korrelation mit bekannten Motiven von zwei Genen mit höherer Genexpression in GFP– als in GFP+ Zellen	46
<b>Abbildung 28:</b> Funktionelle Einordnung von Genen mit dTHS in GO-Gruppen	47
<b>Abbildung 29:</b> Venn-Diagramm von Genen mit dTHS sowie AP1 und/oder SEP3 Bindestelle	48
<b>Abbildung 30:</b> Korrelation von Chromatinzugänglichkeit und Genexpression	49
<b>Abbildung 31:</b> GO-Netzwerk von hochregulierten Genen in GFP+ oder GFP– Zellen im Vergleich zum Infloreszenzmeristem	82
<b>Abbildung 32:</b> GO-Netzwerk von Genen, die in GFP+ und GFP– Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem gleich differenziell transkribiert werden	83
<b>Abbildung 33:</b> GO-Netzwerk von Genen, die nur in GFP– Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem differenziell transkribiert werden	84
<b>Abbildung 34:</b> Transkriptlevel von <i>Aux/IAA</i> und <i>PIN</i> Genen	84
<b>Abbildung 37:</b> Venn-Diagramm von Genen mit THS sowie AP1 oder SEP3 Bindestelle	85
<b>Abbildung 38:</b> Venn-Diagramm von THS-Genen im Vergleich zu differenziell transkribierten Genen	86
<b>Abbildung 39:</b> Heatmap der Chromatinzugänglichkeit der hoch- und herunterregulierten Gene	87

## Kurzzusammenfassung

Die *DRNL*-Expression markiert Gründerzellen lateraler Seitenorgane im Infloreszenzmeristem (IM) von *Arabidopsis thaliana*. Für die Analyse des Transkriptoms sowie der Chromatinstruktur der Gründerzellen wurden die *DRNL*-exprimierenden Zellen (GFP+) von den umgebenden Zellen (GFP-) des *apetala1-1 cauliflower-1* IMs getrennt. Sowohl die Genaktivität als auch die mittels „Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing“ (ATAC-Seq) identifizierte Chromatinzugänglichkeit weisen genspezifische Unterschiede zwischen den beiden Zelltypen auf. Gene mit Tn5 Transposase hypersensitive Stellen (THSs) weisen eine stärkere Transkription auf, dies spiegelt sich in der häufigen Lokalisation von THSs am Transkriptionsstart wider. Für differenziell regulierte Gene konnte eine Korrelation mit einer erhöhten Chromatinzugänglichkeit entweder in GFP+ oder GFP- Zellen (dTHS) beobachtet werden. In GFP+ Zellen hochregulierte Gene weisen zugänglicheres Chromatin in den GFP+ Zellen (dTHS+) auf bzw. die herunterregulierten Gene in GFP- Zellen (dTHS-). Eine Zuordnung der Gene in Genontologiegruppen zeigt funktionelle Übereinstimmungen für die hochregulierten und dTHS+ Genen bzw. die herunterregulierten und dTHS- Genen. Die GFP+ Zellen haben Anteil an der Blütenentwicklung und stehen damit im direkten Zusammenhang zu den *DRNL*-exprimierenden Gründerzellen, die GFP- Zellen sind im Gegensatz zum großen Teil mit der Antwort auf Stress assoziiert. Daher zeigen die Gründerzellen spezifische Unterschiede in der Genaktivität in Korrelation mit der Chromatinkonformation im Vergleich zu den restlichen Zellen des IMs. THSs zeigen eine hohe positionelle Übereinstimmung mit konservierten DNA-Sequenzen sowie AP1 und SEP3 Bindestellen; AP1 bindet eher dTHS+ Gene, SEP3 hingegen dTHS- Gene. Die hohe Sensitivität der ATAC-Seq Methode ermöglicht daher die Identifikation von *cis*-regulatorischen Elementen, auch an Positionen die erst zu einem späteren Zeitpunkt besetzt werden.

## Abstract

*DRNL*-expression marks lateral organ founder cells (LOFCs) in the inflorescence meristem (IM) of *Arabidopsis thaliana*. To analyse the transcriptome and chromatin structure of LOFCs *DRNL*-expressing cells (GFP+) were separated from their non-expressing neighbours (GFP-) in the *apetala1-1 cauliflower-1* IM. Cell-type specific differences in gene activity as well as in chromatin accessibility determined by ATAC-Seq ("Assay for Transposase-Accessible Chromatin with highthroughput sequencing") could be identified. An increased chromatin accessibility (THS) is accompanied by an elevated transcription rate correlating to frequent THSs at the transcription start site. Similarly differentially expressed genes show differential chromatin accessibility in the comparison of GFP+ and GFP- cells (dTHS). In GFP+ cells upregulated genes exhibit more likely open chromatin in GFP+ cells (dTHS+) and downregulated genes in GFP- cells (dTHS-), respectively. Networks of gene ontology groups show great similarity of upregulated and dTHS+ genes or downregulated and dTHS- genes. In GFP+ cells flower development takes place correlating to *DRNL*-expressing LOFCs whereas GFP- cells are associated with stress response. Thus specific differences between LOFCs and their adjacent cells could be established in terms of gene activity corresponding to chromatin structure. The DNA-sequence in the centre of THSs is often conserved and coincides with AP1 and SEP3 binding sites, AP1 binds more likely in dTHS+ in contrast to SEP3 correlating with dTHS- genes. Therefore the high sensitivity of ATAC-Seq enables the identification of *cis*-regulatory elements independently of the point in time of transcription factor binding.

# 1 Einleitung

## 1.1 Die Modellpflanze *Arabidopsis thaliana*

Die dikotyle Pflanze *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) gehört zur Gattung der *Brassicaceae* und wird als Modellpflanze bezeichnet (Somerville und Koornneef, 2002), da sie einige Vorteile für wissenschaftliche Experimente bietet und daher häufig verwendet wurde bzw. wird. Das relativ kleine Genom von ungefähr 140 Mega-Basenpaaren verteilt sich auf fünf Chromosomen (Derelle et al., 2006). Aufgrund des diploiden Chromosomensatzes können molekularbiologische Methoden im Vergleich zu polyploiden Pflanzen leicht durchgeführt werden. Genetische Manipulationen werden mittels Transformation mit *Agrobacterium tumefaciens* erreicht. Außerdem weist *A. thaliana* eine kurze Generationszeit auf, ist einfach zu kultivieren und produziert viele Samen.

Das vollständig sequenzierte Genom von *A. thaliana* wurde im Jahre 2000 veröffentlicht (The Arabidopsis Genome Initiative, 2000). Es konnten 33.602 Gene identifiziert werden (TAIR10), davon werden 28.496 transkribiert bzw. 27.416 kodieren für ein Protein.

## 1.2 Das Infloreszenzmeristem von *A. thaliana*

Die zentral im Sprossapikalmeristem (SAM) von *A. thaliana* liegende Initialenzone umfasst Stammzellen, von denen nach Teilung Zellen in die periphere Determinationszone übergehen, in der das Schicksal der Zellen festgelegt werden kann. Da am SAM neue Blätter entstehen, muss für die Ausbildung von Blüten zuerst die Transition aus dem vegetativen SAM in das reproduktive Infloreszenzmeristem (IM) erfolgen. Verschiedene Signale können für die Transition von SAM zu IM verantwortlich sein; dazu gehören Gibberellin, Kälte- sowie Lichtstimuli (Okada und Shimira, 1994). Viele Gene sind an dem Prozess der Signalantwort bzw. Transition beteiligt und bilden komplexe Genregulationsnetzwerke, die auch zwischen den Signalwegen der einzelnen Stimuli Überschneidungen aufweisen (Conti, 2017). Die Zahl der Stammzellen im Zentrum des IMs wird durch *WUSCHEL* (*WUS*, AT2G17950) und drei *CLAVATA* (*CLV*) Gene reguliert (Schoof et al., 2000). *WUS* ist verantwortlich für die Erhaltung der Stammzellpopulation, *CLV* reprimiert die Expression von *WUS* und fördert dadurch die Spezifizierung bzw. Determinierung der Stammzellen. Weitere Signale, z. B. Auxin, können die

Spezifizierung von Stammzellen zu Gründerzellen bewirken (Chandler, 2011). Die Gründerzellen umfassen einen Teil der lateralen bzw. am Rand des IMs lokalisierten Zellen, an dem sich neue Organprimordien ausbilden.

Für die Ausbildung von Blüten wird das florale Meristem neu angelegt und einzelne Organe werden gebildet, an beiden Vorgängen ist *APETALA1* (*AP1*, AT1G69120) beteiligt (Mandel et al., 1992; Weigel et al., 1992). Die in vier Wirteln angeordneten Sepale, Petale, Stamen und das Gynoeceum werden durch Gene definiert, die in das klassische ABC-Modell (Coen und Meyerowitz, 1991) eingeteilt werden. Zusätzlich konnten die E-Klasse *SEPALLATA* (*SEP*) Gene (Pelaz et al., 2000; Ditta et al., 2004) identifiziert werden; die vier Transkriptionsfaktoren sind redundant und regulieren im Komplex mit weiteren Transkriptionsfaktoren die Entwicklung aller Blütenorgane (Honma und Goto, 2001; Jack, 2001; Ditta et al., 2004).

Die Zielgene von AP1 (Kaufmann et al., 2010b; Pajoro et al., 2014) sowie SEP3 (Pajoro et al., 2014) wurden im *apetala1-1 cauliflower-1* (*ap1cal*) Infloreszenzmeristem (Bowman et al., 1993) identifiziert. Das Gen *CAULIFLOWER* (*CAL*; AT1G26310) ist redundant zu *AP1*; in der *ap1cal* Mutante werden an der Position im IM, an der im Wildtyp Blüten entstehen, weitere IMs gebildet. Blüten werden in der *ap1cal* Mutante abhängig von den Wachstumsbedingungen später als im Wildtyp gebildet, die *ap1cal* Mutante hat daher ein größeres Infloreszenzmeristem, dessen Zellen länger als im Wildtyp im undifferenzierten Zustand verharren. Die Transformation von *ap1cal* Pflanzen mit AP1 als translationale Fusion mit dem Ratten Glukokortikoidrezeptor (GR) sowie der induzierbare Kernimport mittels Applikation des synthetischen Glukokortikoids Dexamethason (Dex) (Picard et al., 1988; Lloyd et al., 1994) ermöglicht die Rettung des *ap1cal* Phenotyps bzw. eine synchronisierte Blüteninduktion. Spezifisch gebundene DNA-Fragmente konnten nach zwei bzw. acht Tagen kontinuierlicher Dex-Applikation sowie Verwendung von Antikörpern gegen GR bzw. SEP3 mittels Chromatin-Immunopräzipitation (Orlando und Paro, 1993) angereichert sowie anschließender Hochdurchsatz-Sequenzierung (ChIP-Seq) identifiziert werden (Pajoro et al., 2014), um die AP1 bzw. SEP3 Bindestellen bzw. Zielgene zu ermitteln.

### 1.3 Phytohormone in der Organbildung

Auxin und Cytokinin sind zwei Phytohormone, die an der Ausbildung von Organen am SAM bzw. IM involviert sind, äußerlich appliziert bewirken sie das Auswachsen von Organen

(Reinhardt et al., 2003; D'Aloia et al., 2011). Im IM aktive *YUCCA* (*YUC*) Gene, die an einem der tryptophanabhängigen Biosynthesewege von Auxin beteiligt sind, lassen darauf schließen, dass Auxin in diesem Gewebe biosynthetisiert wird und dies für eine wildtypische Blütenbildung notwendig ist (Cheng et al., 2006). Ein gerichteter Transport von Auxin, reguliert von *PIN-FORMED 1* (*PIN1*, AT1G73590) in Abhängigkeit von *MONOPTEROS* (*MP*, *ARF5*, AT1G19850), führt zur Akkumulation dieses Phytohormons in den Primordien von entstehenden Blüten im IM (Bhatia et al., 2016). Ein Anstieg der Auxinkonzentration vermittelt die Bindung des F-box TRANSPORT INHIBITOR RESPONSE 1/AUXIN SIGNALING F-BOX PROTEINS (*TIR1/AFB*) Auxin Korezeptoren an Aux/IAA Proteine, die sich dadurch von den an Auxin responsiven Elementen (AuxREs) gebundenen Auxin Response Factors (ARFs) lösen (Lavy und Estelle, 2016). Die Aux/IAA Proteine werden daraufhin durch das Proteasom abgebaut und die Transkription von ARF Zielgenen kann beginnen (Liu et al., 1994; Guilfoyle et al., 1998; Pandey et al., 2018).

Cytokinin kann in der gesamten Pflanze nachgewiesen werden und wird über das Leitgewebe transportiert (Kudo et al., 2010). Im Gegensatz zu Auxin ist Cytokinin eher im Zentrum des IMs als in den Primordien zu finden (Besnard et al., 2014), dennoch gibt es auch Überschneidungen zwischen beiden Signalwegen (Zhang et al., 2011; Besnard et al., 2014). Die Cytokinin-Antwort (Pekárová et al., 2016) erfolgt über die Bindung von extrazellulärem Cytokinin an Rezeptoren in der Zellmembran, woraufhin HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER (AHPs) phosphoryliert werden. Eine Ausnahme ist AHP6, bei diesem Protein ist Histidin durch Asparagin ersetzt und verliert dadurch die Fähigkeit zum Übertragen der Phosphatgruppe. AHP6 wirkt daher regulierend bzw. hemmend auf die zeiträumliche Ausprägung des Cytokininsignalwegs (Mähönen et al., 2006; Besnard et al., 2014).

AHP1-5 übertragen die Phosphatgruppe auf Typ-B RESPONSE REGULATORS (*ARRs*) (Pils und Heyl, 2009), die aktivierend auf die Transkription von Zielgenen wirken; dazu gehören unter anderem Typ-A *ARRs*. Die dritte Gruppe der *ARRs*, Typ-C, verhält sich atypisch, da ihre Expression nicht durch Zugabe von Cytokinin induziert werden kann. Typ-A *ARRs* sind Teil einer negativen Rückkopplung, d. h. sie hemmen die Cytokininantwort durch inhibitorische Regulation der Typ-B *ARRs* auf unbekannte Weise (Ren et al., 2009; Pekárová et al., 2016). Eine weitere Aufgabe der Typ-A *ARRs* ist die Regulation von PIN Proteinen in Infloreszenzen, die sich in einer antagonistischen Reaktion im Vergleich zum Typ-B *ARR1* manifestiert (Waldie



und Leyser, 2018). Außerdem sind Typ-A *ARRs* in der Initialenzone des IMs aktiv und regulieren dort die Meristemgröße (Leibfried et al., 2005; Zhao et al., 2010). Eine Regulation der Cytokininantwort wird durch den Transport von Cytokinin aus dem Apoplast in die Zelle und der daraus resultierenden Inaktivierung erreicht (Zürcher et al., 2016).

#### **1.4 Festlegung der adaxialen-abaxialen Polarität in Organen**

Blätter sind durch eine adaxiale sowie abaxiale Seite gekennzeichnet. Auch bei der Entwicklung von Blütenorganen konnten Gene, die diese Polarität festlegen, bereits in Organprimordien nachgewiesen werden (Siegfried et al., 1999; Otsuga et al., 2001). *LEAFY* (*LFY*, AT5G61850), *PHABULOSA* (*PHB*, AT5G61850), *PHAVOLUTA* (*PHV*, AT1G30490) sowie *REVOLUTA* (*REV*, AT5G60690) definieren die Zellen auf der adaxialen Seite (Yamaguchi et al., 2012; Emery et al., 2003). Antagonistisch zu diesen Genen wirken die *YABBY* (*YAB*) und *KANADI* (*KAN*) Gene sowie *BLADE ON PETIOLE* (*BOP*) 1 (AT3G57130) und 2 (AT2G41370) auf die Determinierung der abaxialen Seite von Organen (Siegfried et al., 1999; Ha et al., 2007; Wu et al., 2008; Bonaccorso et al., 2012). *BREVIPEDICELLUS* (*BP*, AT4G08150) nimmt durch die Regulation der Expression von *BOP1* und 2 Einfluss auf die adaxiale-abaxiale Polarität (Khan et al., 2012; Byrne et al., 2000). Zusätzlich wird eine medio-laterale Achse festgelegt, die unter anderem von *PRESSED FLOWER* (*PRS*, AT2G28610) sowie *YAB*-Genen beeinflusst wird (Matsumoto und Okada, 2001).

#### **1.5 Chromatinstruktur und Transkriptionsfaktoren**

Verschiedene Methoden können eingesetzt werden, um die Chromatinstruktur zu analysieren. Dazu gehören die Isolation von nicht im Nukleosom vorliegender DNA mittels „Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements“ (FAIRE) (Simon et al., 2012) und der Verdau von ungebundener DNA durch Deoxynuklease I (DNase I; Song und Crawford, 2010) bzw. Micrococcal Nuklease (MNase; Kundaje et al., 2012) mit anschließender Isolation der gebundenen DNA. Eine folgende Anwendung von „Next-Generation Sequencing“ (NGS; Mardis, 2008) ermöglicht die genomweite Identifikation von offenem bzw. geschlossenem Chromatin. Die DNase-Seq wurde von Pajoro et al. (2014) eingesetzt, um die Regionen mit offenem Chromatin bzw. DNase I hypersensitive Stellen (DHSs) im *ap1ca* IM zu ermitteln. The „Assay for Transposase-Accessible Chromatin“ (ATAC) -Seq ist eine relativ neue Methode zur Ana-

lyse der Chromatinstruktur, in der die Chromatinzugänglichkeit gegenüber Tn5 Transposase festgestellt wird und schon mit geringen Zellzahlen durchgeführt werden kann (Buenrostro et al., 2013). Anwendung fand diese Methode zuerst bei tierischen Zellen, seit 2017 wird sie jedoch auch für Pflanzen adaptiert, sodass Tn5 Transposase hypersensitive Stellen (THS) in Jungpflanzen (Lu et al., 2016), der Wurzel (Maher et al., 2017), Mesophyll- sowie Stammzellen des SAM identifiziert werden konnten (Sijacic et al., 2018). Kombiniert wird ATAC-Seq häufig mit einer vorausgehenden Isolation der Nuklei mittels „Fluorescence-Activated Nuclei Sorting“ (FANS) (Lu et al., 2016) bzw. INTACT (“Isolation of Nuclei Tagged in specific cell types”) (Maher et al., 2017; Sijacic et al., 2018), um die Ausbeute an nuklearer DNA zu maximieren sowie Kontamination zu minimieren.

Transkriptionsfaktoren binden an spezifische cis-regulatorische Elemente im Chromatin, wodurch eine Veränderung in der Chromatinzugänglichkeit (Pajoro et al., 2014) bzw. der Genexpression erfolgen kann. Die Bindestelle von Transkriptionsfaktoren umfasst eine kurze Nukleotidfolge (Franco-Zorrilla et al., 2014; Isakova et al., 2017; Teif und Rippe, 2011), mehrere Transkriptionsfaktoren können jedoch einen Komplex bilden, das Enhanceosom, welches über einen größeren Bereich bindet (Carey, 1998; Panne, 2008). TATA-binding Proteine (TBP) binden beispielsweise an die TATA-Box in Promotoren und rekrutieren den Präinitiationskomplex, sodass die Transkription ermöglicht wird (Murakami et al., 2015; Thomas und Chiang, 2006). Ebenso kann sich die Genexpression abhängig von Histonmodifikationen verändern. Die mit einer dreifachen Methylierung des Lysins 4 von Histon 3 (H3K4me3) assoziierten aktiven Gene bzw. die mit dreifach methyliertem Lysin 27 am Histon 3 (H3K27me3) markierten inaktiven Gene wurden im *ap1cal* IM identifiziert (Engelhorn et al., 2017).

## 1.6 Der Transkriptionsfaktor DORNRÖSCHEN-LIKE

*DORNRÖSCHEN-LIKE* (*DRNL*, AT1G24590) kodiert in *A. thaliana* für einen Transkriptionsfaktor mit AP2-Domäne, die eine Bindung an DNA ermöglicht (Ikeda et al., 2006). Ebenso wie das zu *DRNL* orthologe Gen *LEAFLESS* in der Tomate (Capua und Eshed, 2017) ist *DRNL* an der Blütenbildung beteiligt; die mutierte AP2-Domäne der *b class modifier 1* (*bcm1*)/*drnl-2* Mutante bedeutet einen Defekt in der Stamenbildung (Nag et al., 2007). Die *DRNL*-Expression markiert sowohl Gründerzellen von lateralen Seitenorganen bzw. des Tragblatts im IM als auch die Gründerzellen der einzelnen Blütenorgane (Chandler et al., 2011b; Chandler und Werr,

2014; Comelli et al., 2016) und ist zu einem frühen Zeitpunkt, vor der Auswölbung eines Blütenprimordiums, im IM aktiv (Chandler und Werr, 2014). Auch in *ap1cal* IMs ist die *DRNL*-Expression in einer zum Wildtyp ähnlichen Phyllotaxis angeordnet und sollte auch in dieser Mutante die Gründerzellen lateraler Seitenorgane markieren (Chandler und Werr, 2014).

*DRNL* und *DORNRÖSCHEN* (*DRN*, AT1G12980) sind paraloge Gene, deren Expressionsdomänen sich im IM kaum überschneiden. Dennoch weist *DRN* ebenso wie das nah verwandte Gen *PUCHI* (AT5G18560) Redundanz zu *DRNL* auf (Kirch et al., 2003; Chandler und Werr, 2017). *DRNL* sowie *DRN* werden beide nicht nur im IM sondern auch im Embryo exprimiert und sind an der Ausbildung der apikalen-basalen Polarität sowie der Entwicklung von Kotyledonen beteiligt (Chandler et al., 2008; Chandler et al., 2011a). In frühen Stadien kann die Expression beider Gene in denselben Zellen nachgewiesen werden, ab dem Torpedostadium bilden sie jedoch separate Expressionsdomänen aus, *DRNL* an der Spitze der Kotyledonen bzw. *DRN* im SAM (Chandler et al., 2011a). Eine Analyse des Transkriptoms von mittels „Fluorescence-activated cell sorting“ (FACS) isolierten *DRN*- bzw. *DRNL*-exprimierenden Zellen erfolgte in Kallusgewebe von *A. thaliana* Embryonen (Cole et al., 2013). Für die Sequenzierung der mRNA wurde ein DNA Microarray (Schena et al., 1995) durchgeführt, alternativ könnte auch die NGS-Methode RNA-Seq (Morin et al., 2008) angewendet werden.

Im Vergleich zum Auxinsignal, welches mittels des DR5-Reporters (Ulmasov et al., 1997) dargestellt wurde und ebenfalls Blütenprimordien im IM markiert, überschneidet sich die Expressionsdomäne mit *DRNL* nur geringfügig, aber sie verlaufen zeitlich parallel (Chandler und Werr, 2014). Anders verhält es sich im floralen Meristem, dort werden die Gründerzellen der Blütenorgane zuerst durch *DRNL* und erst nachfolgend durch Auxin markiert (Chandler und Werr, 2014). Deletionsexperimente im *DRNL*-Promotor sowie phylogenetische Analysen führten zur Identifikation von drei Enhancern, von denen zwei Auxin responsive Elemente (AuxREs) enthalten (Comelli et al., 2016). Da die Expression von *DRN* im Embryo von MP reguliert wird, indem es an AuxREs im *DRN*-Promotor bindet (Cole et al., 2009) und das DR5-Signal in der *drnl-1* Mutante gegenüber dem Wildtyp verändert ist (Chandler et al., 2011a), wäre eine Interaktion von *DRNL* mit dem Auxinsignalweg möglich.

Es konnten bereits fünf Zielgene von *DRNL* identifiziert werden, (Ikeda et al., 2006; Eklund et al., 2011): *HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6* (*AHP6*, AT1G80100), *CYCLIN D1;1*

(*CYCD1;1*, AT1G70210), *CUPSHAPED COTYLEDON 1* (*CUC1*, AT3G15170), *LATERAL ROOT PRIMORDIUM 1* (*LRP1*, AT5G12330) sowie *STYLISH 1* (*STY1*, AT3G51060). Der Nachweis der Interaktion von DRNL mit diesen Genen sowie der GCC-Box als Bindestelle erfolgte in der Wurzel bzw. ganzen Jungpflanzen von *A. thaliana* mittels veränderter Genexpression aufgrund einer mutierten GCC-box bzw. nach einem induzierten DRNL-Kernimport. Über *AHP6* kann eine Verbindung von *DRNL* zum Cytokininisignalweg hergestellt werden. *AHP6* fehlt anders als den AHPs 1-5 das für die Übertragung der Phosphatgruppe notwendige Histidin und enthält stattdessen ein Asparagin. Daher ist auch die Wirkung von *AHP6* eine andere, es wirkt regulierend bzw. hemmend auf die zeiträumliche Ausprägung des Cytokininisignalwegs (Mähönen et al., 2006). Exprimiert wird *AHP6* im IM in den Blütenprimordien, ähnlich wie *DRNL* und beeinflusst die Phyllotaxis von Blütenprimordien (Besnard et al., 2014). Die nachgewiesene Interaktion von MP mit dem *AHP6*-Promotor könnte eine Regulation der *AHP6*-Expression als Auxinantwort durch Bindung von MP bedeuten (Besnard et al., 2014) und einen Schnittpunkt zwischen den Signalwegen von Auxin, Cytokinin und *DRNL* darstellen.

## 1.7 Ziel der Doktorarbeit

Im Rahmen dieser Doktorarbeit sollen die *DRNL*-markierten Gründerzellen von lateralen Seitenorganen im IM vor dem Anlegen von floralen Meristemen untersucht bzw. mit den *DRNL*-nicht exprimierenden Zellen verglichen werden. Es wird mit *ap1cal* Pflanzen gearbeitet, da diese ein überproliferierendes IM aufweisen. Die Zahl der *DRNL*-exprimierenden Zellen ist im *ap1cal* IM gegenüber dem Wildtyp erhöht bzw. die Zellen befinden sich in einem ähnlichen entwicklungsbiologischen Stadium. Für eine Trennung der Gründerzellen von den restlichen Zellen des IMs wird das Transgen *DRNL::erGFP* genutzt, um die Isolation der *DRNL*-exprimierenden Gründerzellen mittels FACS zu ermöglichen. Anschließend kann das Transkriptom mittels RNA-Seq sowie die Chromatinstruktur mittels ATAC-Seq analysiert werden. Die daraus resultierenden Ergebnisse sollen Aufschluss über die Expression bzw. Chromatinstruktur von Genen in Gründerzellen im Vergleich zum restlichen IM sowie mögliche Korrelationen zwischen Genaktivität und Chromatinzugänglichkeit geben. Außerdem soll eine ChIP-Seq durchgeführt werden, um weitere direkte Zielgene von *DRNL* zu ermitteln bzw. eine physikalische Bindung an die bereits identifizierten Zielgene nachweisen zu können. Eine Korrelation der Bindestellen von *DRNL* bzw. anderer Transkriptionsfaktoren im *ap1cal* IM mit THSs

könnte die biologische Bedeutung der Chromatinkonformation eruieren. Die Kombination von RNA-, ChIP- sowie ATAC-Seq Ergebnissen soll helfen die Prozesse in den Gründerzellen besser interpretieren zu können sowie Zusammenhänge zwischen *DRNL* und genregulatorischen Netzwerken, z. B. in Bezug auf Phytohormone bzw. die adaxiale-abaxiale Polarität, aufzuklären.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Firmen für Bestellungen von Laborbedarf

<u>Firmen</u>	<u>Adresse</u>
Ambion by life technologies	Darmstadt, Deutschland
Applied Biosystems by life technologies	Darmstadt, Deutschland
Bioline	Luckenwalde, Deutschland
Carl Roth GmbH + Co. KG	Karlsruhe, Deutschland
Cologne Center for Genomics	Köln, Deutschland
Duchefa Biochemie	Haarlem, Niederlande
GATC Biotech	Konstanz, Deutschland
Merck Millipore	Darmstadt, Deutschland
Illumina	Eindhoven, Niederlande
Invitrogen by life technologies	Darmstadt, Deutschland
Qiagen	Hilden, Deutschland
PanReac AppliChem	Darmstadt, Deutschland
Santa Cruz Biotechnology, Inc.	Heidelberg, Deutschland
Sigma-Aldrich Chemie GmbH	München, Deutschland
Thermo Scientific	Darmstadt, Deutschland

#### 2.1.2 Vektoren

pGPTV-Bar ist ein binärer Vektor (Überlacker und Werr, 1996), der eine Selektion von Pflanzen mittels des Herbizids Basta (Kat.-Nr.: 45520, Sigma-Aldrich) ermöglicht. Zusätzlich

enthält der Vektor ein Gen für Kanamycin-Resistenz (Neomycin Phosphotransferase I), um selektiv transgene Bakterien der Art *Agrobacterium tumefaciens* kultivieren zu können. Eine Insertion von *DRNL::DRNL-GR* (von Petra Comelli) wurde über eine *AscI*-Schnittstelle erreicht. Die entsprechenden DNA-Sequenzen befinden sich im Anhang B 8.1.

### 2.1.3 Antibiotika

<u>Name</u>	<u>Endkonzentration in (w/v)</u>	<u>Firma</u>	<u>Katalognummer</u>
Kanamycin	5%	Duchefa Biochemie	K0126
Gentamycin	2,5%	Duchefa Biochemie	G0124
Rifampicin	5%	Duchefa Biochemie	R0146

Zur Herstellung einer konzentrierten Lösung wurde der jeweilige Antikörper in ddH<sub>2</sub>O für Kanamycin sowie Gentamycin bzw. Dimethylsulfoxid für Rifampicin gelöst. Nach steriler Filtration erfolgte die Lagerung bei -20 °C.

### 2.1.4 Antikörper

<u>Bezeichnung</u>	<u>Verwendung</u>	<u>Firma und Katalognummer</u>
Glucocorticoid Receptor alpha Antibody	Anti-GR	Thermo Scientific, PA1-516
Goat anti-Rabbit (H+L) Cross Adsorbed	sekundärer Antikörper	Thermo Scientific, 31462

### 2.1.5 Medien

Flüssiges LB-Medium („lysogeny broth“) besteht aus 0,5% (w/v) Hefeextrakt, 1% (w/v) Trypton sowie 1% (w/v) NaCl und wird auf pH 7 eingestellt. Für die Herstellung von Petri-schalen gefüllt mit festem LB-Medium wurde dem flüssigen LB-Medium 1,5% (w/v) Agar hinzugefügt.

YEB-Medium („yeast extract broth“) ist aus 0,5% (w/v) Rinderextrakt, 0,5% (w/v) Pepton, 0,5% (w/v) Saccharose, 0,1 (w/v)% Hefeextrakt sowie 0,05% (w/v) MgCl<sub>2</sub> zusammengesetzt.

Alle Medien wurden nach der Herstellung autoklaviert. Durch Zugabe von Antibiotika konnte eine Selektion erfolgen.

### 2.1.6 Bakterienstämme

*Agrobacterium tumefaciens* des Stamms GV3101 (Koncz und Schell, 1986) ermöglichte die Transformation von Pflanzen. Dieser Stamm ist resistent gegen Gentamycin und Rifampicin.

### 2.1.7 Kits

<u>Bezeichnung</u>	<u>Firma</u>	<u>Katalognummer</u>
Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit	Stratec	1064100300
MinElute PCR Purification Kit	Qiagen	28004
Nextera DNA Library Preparation Kit	Illumina	FC-121-1030
NucleoSpin Plant II Kit	Macherey-Nagel	740770
QuantiTect Reverse Transcription Kit	Qiagen	205311

### 2.1.8 Software

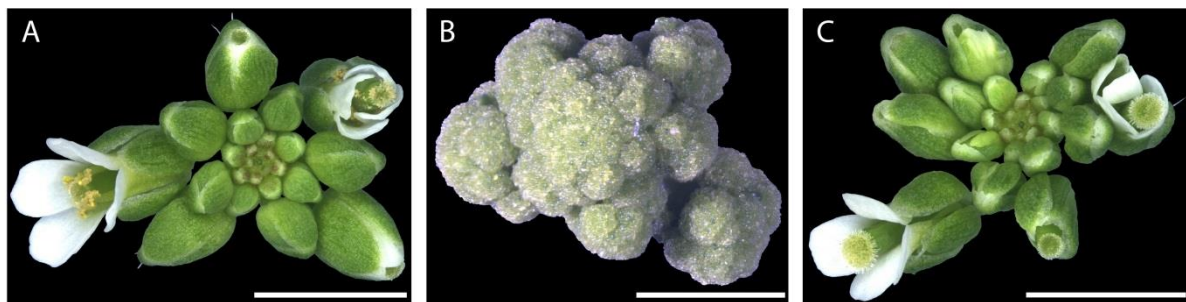
<u>Bezeichnung</u>	<u>Internetadresse</u>	<u>Verwendung</u>
Adobe Photoshop CS5.1		Bildbearbeitung
BiNGO	<a href="http://www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/Home.html">www.psb.ugent.be/cbd/papers/BiNGO/ Home.html</a>	Analyse von RNA-Seq sowie ATAC-Seq Ergebnissen
Cytoscape	<a href="http://www.cytoscape.org/">www.cytoscape.org/</a>	Plattform für BiNGO
Imaris 6.2.1		Bildbearbeitung
Jbrowse	<a href="https://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/">https://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/</a>	Phylogenetic Shadowing
Leica Application Suite V4.5		Stereomikroskop
NCBI Primerblast	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/">www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/</a>	Primerdesign



Oligo Calc	<a href="http://www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html">www.basic.northwestern.edu/biotools/oligocalc.html</a>	Analyse der Sekundärstruktur von Primern
Phytozome 12		Plattform für Jbrowse
Tm Calculator	<a href="http://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator">www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/tm-calculator</a>	Berechnung der Schmelztemperatur von Primern
Venny 2.1	<a href="http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/">http://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/</a>	Erstellung von Venn-Diagrammen
7500 Software v2.3 von Applied Biosystems		qPCR
Zen lite	<a href="https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen-lite.html">https://www.zeiss.com/microscopy/int/products/microscope-software/zen-lite.html</a>	Konfokales Mikroskop

### 2.1.9 Pflanzenmaterial

Es wurde mit Infloreszenzen von *A. thaliana* Pflanzen (Abbildung 1A) gearbeitet, die auf Erde unter Langtagbedingungen, 16 h Licht und 8 h Dunkelheit, herangezogen wurden.



**Abbildung 1: Infloreszenz in *A. thaliana***

Infloreszenzen von *A. thaliana* Wildtyp Pflanzen (A), der *ap1-1 cal-1* Doppelmutterante (B) und der *b class modifier 1* Mutante (C). Der Maßstab beträgt 5 mm.

Es wurden *apetala1-1 cauliflower-1* (*ap1cal*; Bowman et al., 1993) (Nottingham Arabidopsis Stock Centre N6161) Pflanzen verwendet, die ein proliferative Infloreszenzmeristem aufweisen (Abbildung 1B). Für ChIP-Seq Experimente wurden zusätzlich *b class modifier 1* (*bcm1*; Nag et al., 2007) Pflanzen im Landsberg *erecta* Ökotyp untersucht (Abbildung 1C).

Das Sortieren von Protoplasten nach ihrer *DRNL*-Expression wurden mittels Verwendung von *DRNL::erGFP ap1cal* Pflanzen (Frerichs et al., 2016) erreicht. Für den Nachweis von spezifischen Bindungen des DRNL-Proteins an Chromatin mittels ChIP-Seq wurden Pflanzen mit dem Transgen *DRNL::DRNL-GR in ap1cal* generiert bzw. in *bcm1* (von Petra Comelli) untersucht.

Für RNA-, ATAC- sowie ChIP-Seq wurden Infloreszenzen circa fünf Wochen nach dem Aussähen vor der histologischen Evidenz von Blüten gesammelt und entsprechend der nachfolgenden Methode weiter behandelt.

Für die Bestätigung der erfolgreichen Transformation von Pflanzen wurde gDNA aus Blättern unter Verwendung des NucleoSpin Plant II Kits isoliert sowie mittels PCR genotypisiert.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Identifikation von konservierten Regionen

Der Vergleich von orthologen Genomsequenzen mehrerer Arten nennt sich „Phylogenetic Shadowing“ (Boffelli et al., 2003). Das Department of Energy's Joint Genome Institute (Kalifornien, USA) veröffentlichte das Programm Phytozome 12, mit dem die Genome verschiedener Pflanzenarten untersucht werden können. Die in Phytozome vorliegenden Daten können im Zusammenhang mit dem Programm JBrowse (<https://phytozome.jgi.doe.gov/jbrowse/>) genutzt werden, um die Darstellung des Konservierungsgrades der DNA-Sequenz zwischen verschiedenen Pflanzenarten zu ermöglichen. Es wurde die genomische DNA-Sequenz von *Arabidopsis thaliana* (TAIR10) mit denen der folgenden den *Brassicaceae* angehörenden Arten verglichen: *Arabidopsis halleri* v1, *Arabidopsis lyrata* v1, *Brassica rapa* v1, *Boechera stricta* v1, *Capsella grandiflora* v1, *Capsella rubella* v1 sowie *Eutrema salsugineum* v1. Nicht-transkribierte Regionen zwischen einzelnen Genen, die eine Übereinstimmung der DNA-Sequenz von mindestens 75% aufweisen, werden als konserviert angesehen und markiert.

### 2.2.2 Mikroskopie

Makroskopische Aufnahmen von Infloreszenzen wurden mit dem Stereomikroskop Leica MZ16 FA von Leica Microsystems durchgeführt und mit Leica Application Suite V4.5 bearbeitet.

Die Dokumentation von Fluoreszenzmission in *A. thaliana* Zellen wurde mit dem Zeiss LSM 700 konfokalem Mikroskop sowie dem Programm Zen lite durchgeführt. Die Detektion der GFP-Fluoreszenz erfolgte nach Anregung bei 488 nm über eine Messung der Fluoreszenzmission bei 480 bis 560 nm. Die Autofluoreszenz der Chloroplasten wurde bei 639 nm angeregt und bei 640 - 700 nm detektiert. Die nachfolgende Bildbearbeitung wurde mit dem Programm Imaris 6.2.1 durchgeführt.

### 2.2.3 Transformation von *Agrobacterium tumefaciens*

Die Transformation von *A. tumefaciens* mit *DRNL::DRNL-GR* im pGPTV-Vektor erfolgte mittels Elektroporation (modifiziert nach: Wen-Jun und Forde, 1989). Es wurde 1 µl Plasmid (ca. 20 ng) im Verhältnis zu 50 µl *A. tumefaciens* ( $OD_{600} = 0,1 - 0,5$ ) eingesetzt und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Elektroporation wurde in einer Küvette in einem Elektroporator bei einer angelegten Spannung von 1,8 V für 1 – 2 s durchgeführt. Zur Regeneration der Zellen wurde sofort 700 µl YEB-Medium hinzugefügt, eine Inkubation von 2 h bei 28°C unter ständiger Bewegung der Flüssigkeit folgte. Im Anschluss konnten die Zellen auf YEB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin, Gentamycin und Rifampicin ausgestrichen werden. Die Platten wurden für zwei Tage bei 28°C inkubiert.

### 2.2.4 Transformation von Pflanzen

Die Transformation von *A. thaliana* Pflanzen erfolgte nach der „Floral Dip“-Methode (Clough und Bent, 1998). Zuerst wurde 10 ml LB-Medium mit den Antibiotika Kanamycin, Gentamycin und Rifampicin versetzt sowie mit einer Einzelkolonie von *A. tumefaciens* angeimpft. Aus dieser Vorkultur wurden 2 ml in eine Hauptkultur, bestehend aus 30 ml LB-Medium und ebenfalls den entsprechenden Antibiotika, überführt. Die Inkubation der Kulturen erfolgte jeweils bei 28°C für circa 24 h. Nach Zentrifugation der Hauptkultur (5.000 g, 15 min) wurde das Pellet aus *A. tumefaciens* in 1 l Infiltrationsmedium (146 mM Saccharose, 0,02% (v/v) Silwet L-77) resuspendiert. Die zu infiltrierenden Pflanzen wurden für jeweils 15 min in das

Infiltrationsmedium mit *A. tumefaciens* getaucht. Zur Infiltration von *ap1cal* Pflanzen wurden circa sieben bis acht Wochen alte Pflanzen mit *A. tumefaciens* transformiert. Transgene Pflanzen enthalten zusätzlich zu dem Gen von Interesse eine Basta-Resistenz, somit kann eine Selektion mit einer 0,125%igen Basta-Lösung erfolgen (Akama et al., 1995).

### **2.2.5 Isolation von Nukleinsäuren**

Die Isolation von RNA wurde mit dem Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit von Stratec durchgeführt.

Für Genotypisierungen von Pflanzen wurde die gDNA mit dem NucleoSpin Plant II Kit von Macherey-Nagel isoliert.

Die Aufreinigung der gDNA im Anschluss an die ATAC- bzw. ChIP-Methode erfolgte mit dem MinElute PCR Purification Kit von Qiagen.

Die Anweisungen der Hersteller wurden bezüglich der Versuchsdurchführung befolgt.

### **2.2.6 Reverse Transkription**

Für die Herstellung von cDNA aus mRNA wurde das QuantiTect Reverse Transcription Kit von Qiagen verwendet. Die Durchführung erfolgte wie im Protokoll der Hersteller beschrieben. Die maximalen Mengenangaben von 1 µg RNA bzw. 12 µl Probenvolumen pro Reaktion wurden nicht überschritten.

### **2.2.7 Design von Primern**

Primer wurden mit dem Programm Primer-Blast des National Center for Biotechnology Information ausgewählt. Eine zusätzliche Überprüfung konnte mittels Tm-Calculator von New England Biolabs GmbH zur Bestätigung der Schmelztemperatur sowie dem Oligoneucleotide Properties Calculator (Kibbe, 2007) zur Vermeidung von Sekundärstrukturen erfolgen.

Für den Einsatz von Primern in der qPCR müssen weitere Kriterien beachtet werden. Das zu amplifizierende Fragment sollte bei einer Größe von 48 - 145 bp bei Einsatz des SYBR Select Master Mix (life technologies) bzw. 80 - 200 bp liegen, wenn das Sensi FAST SYBR Lo-ROX Kit von Bioline verwendet wurde. Es wurde eine Hybridisierungstemperatur von 60°C angestrebt, die Differenz der Schmelztemperatur von Forward und Reverse Primer sollte nicht

mehr als 1°C betragen. Nukleotidwiederholungen sowie die Positionierung der Nukleinbase Guanin am 5`-Ende bzw. mehr als zwei der Nukleinbasen Guanin/Cytosin am 3`-Ende sollten vermieden werden.

Die Herstellung der Primer wurde bei der Firma Sigma-Aldrich in Auftrag gegeben.

Die verwendeten Primer sind im Anhang A 7.1 zu finden.

### **2.2.8 Polymerase-Kettenreaktion**

Für die Amplifikation von DNA-Sequenzen wird die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nach Mullis et al. (1987) angewandt. Es wurde der C1000 Thermal Cycler der Firma Biorad verwendet. Die Hybridisierungstemperatur und die Elongationszeit wurden entsprechend der Schmelztemperatur der Primer bzw. der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments eingestellt. Anschließend konnten die DNA-Fragmente mittels Agarose-Gelelektrophorese anhand ihrer Größe aufgetrennt werden. Es wurde der my-Budget 5x PCR Mastermix RtL von Bio-Budget verwendet.

### **2.2.9 Quantitative Echtzeit-PCR**

Die quantitative Echtzeit-PCR (qPCR) (Higuchi et al., 1993) wurde mit dem System 7500 Fast Real-Time PCR System von Applied Biosystems durchgeführt. Es wurde der SYBR Select Master Mix (life technologies) oder das Sensi FAST SYBR Lo-ROX Kit (Bioline) eingesetzt. Es wurden die jeweiligen Angaben der Hersteller für die Versuchsdurchführung befolgt, Modifikationen resultierten aus der Verwendung von Primern mit einer Hybridisierungstemperatur unter 60°C. Es wurden pro Versuchsansatz auf einer 96-Loch-Mikrotiterplatte mindestens zwei biologische Replikate sowie drei technische Replikate analysiert. Bedingt durch niedrige DNA-Mengen waren in Ausnahmefällen nur zwei technische Replikate möglich. Es wurde bei jedem Versuch das Primerpaar *ACTIN 2* (AT3G18780) als Kontrolle eingesetzt, um eine Normalisierung und Vergleichbarkeit von mehreren Versuchen zu erreichen. Nach jedem Versuchsdurchlauf wurde im Anschluss an die Amplifikation eine Schmelzkurve erstellt, um die Anreicherung eines spezifischen DNA-Fragments zu bestätigen.

Die Quantifizierung der amplifizierten DNA-Fragmente konnte mittels Detektion der SYBR Green Fluoreszenz der doppelsträngigen DNA erreicht werden. Erste Analysen erfolgten mit dem Programm 7500 Software v2.3 (Applied Biosystems), welches als Vergleichswert zwi-

schen den einzelnen Reaktionsabläufen auf einer Mikrotiterplatte den Ct („cycle threshold“-Wert) ausgibt. Für die weitere Auswertung wurde die  $\Delta\Delta\text{Ct}$  Methode (Livak und Schmittgen, 2001) genutzt. Hierfür wird der Ct-Wert einer Probe in Relation zu einer Kontrollprobe gesetzt. Zusätzlich erfolgte eine Normalisierung unter Einberechnung der Primereffizienz sowie der Amplifikation von *ACTIN 2*. Unterschied sich der Ct-Wert eines der drei technischen Replikate um mehr als 0,5 von den zwei anderen, wurde dieses technische Replikat nicht in den weiteren Berechnungen berücksichtigt. Wenn keine Amplifikation messbar war, wurde ein Ct-Wert von 40 angenommen.

#### **2.2.10 DNA-Sequenzierung**

Einzelne PCR-Produkte wurden von der Firma GATC Biotech sequenziert.

Genomweite Sequenzierungen in Zusammenhang mit RNA-Seq, ATAC-Seq und ChIP-Seq sind bei der Firma Cologne Center for Genomics in Auftrag gegeben worden.

#### **2.2.11 Fluoreszenzabhängige Sortierung von Zellen**

Bei der FACS-Methode („Fluorescence-activated cell sorting“; Birnbaum et al., 2005) werden Protoplasten anhand ihrer Fluoreszenzemission sortiert. Es wurden Infloreszenzmeristeme von circa 700 *DRNL::erGFP ap1cal* Pflanzen verwendet. Zum Zeitpunkt des Erntens zeigten die Pflanzen noch keine histologischen Anzeichen der Blütenentwicklung. Zur Gewinnung von Protoplasten wurden die geernteten Infloreszenzen in 30 ml FACS-Medium (10 mM KCl, 2 mM  $\text{MgCl}_2$ , 2 mM  $\text{CaCl}_2$ , 1 g/l BSA, 0,4 g/l MES, 109,3 g/l Mannitol, pH 5,5) ergänzt mit den Enzymen Cellulase (20 g/l; Kat.-Nr.: C1794, Sigma-Aldrich) und Pectolyase (1 g/l; Kat.-Nr.: P3026, Sigma-Aldrich) für 90 min unter ständiger Bewegung der Lösung inkubiert. Eine anschließende Trennung von FACS-Medium und Protoplasten vom übrigen Pflanzengewebe erfolgte über ein 40  $\mu\text{m}$  Sieb. Die Protoplasten wurden nachfolgend pelletiert (500 rpm, 10 min, 4°C) sowie in 0,5 – 2 ml FACS-Medium resuspendiert, um eine Konzentration von etwa  $7 \times 10^7$  Zellen/ml zu erreichen. Im Anschluss konnten die Protoplasten mit einem FACS Vantage SE (Becton Dickinson) in einem Zeitraum von maximal 1 h anhand ihrer GFP-Expression sortiert (Fließrate: 36.000 Zellen/s, Düsendurchmesser: 100  $\mu\text{m}$ ) werden (Herzenberg et al., 1976). Die Fluoreszenz von GFP wurde mit einem Filter der Wellenlänge 500 – 520 nm gemessen. Als Kontrolle diente ein Filter zur Detektion der Autofluoreszenz von Phycoery-

thrin, ein akzessorisches Pigment der Photosynthese, bei 564 – 606 nm. Die Anzahl der gesammelten Protoplasten sowie das Medium, in dem die sortierten Zellen gesammelt wurden, korrespondierten mit der jeweils nachfolgenden Methode (siehe RNA-Seq 2.2.12 bzw. ATAC-Seq 2.2.14).

### **2.2.12 Isolation und Sequenzierung des Transkriptoms**

Zur Analyse des Transkriptoms von Infloreszenzen von *ap1cal DRNL::erGFP A. thaliana* Pflanzen wurde aus 100.000 bis 700.000 sortierten Protoplasten RNA isoliert sowie sequenziert (RNA-seq) (Lister et al., 2008). Die nach ihrer Fluoreszenzemission sortierten Protoplasten wurden in 9,9 ml Lysis Solution DCT (Kat.-Nr.: 1064100300, Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit, Stratec), supplementiert mit 100 µl Dithiothreitol und 10 µl RNase Inhibitor (1 U/µl; Kat.-Nr.: AM2694, Ambion by Life Technologies), aufgefangen. Die Isolation der RNA erfolgte mit dem Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit. Es wurden jeweils vier biologische Replikate am Cologne Center for Genomics sequenziert. Zusätzlich wurde RNA direkt aus *ap1cal* Infloreszenzen mit dem Invitrap Spin Plant RNA Mini Kit isoliert und ebenfalls sequenziert.

Die Sequenzierung der Proben mit jeweils einer Gesamtmenge von 200 ng RNA erfolgte mit dem 2 × 100nt v3 „paired end“ Protokoll auf einem Illumina GAIIx Sequenzierer.

### **2.2.13 Isolation von spezifisch gebundenen Chromatinregionen**

Die hier verwendete ChIP-Seq Methode beruht mit einigen Adaptionen auf dem Protokoll von Kaufmann et al. (2010a). Dexamethason (0,1 mM Dex von Sigma Aldrich, Kat.-Nr.: D1756, 0,1% (v/v) Ethanol, 0,015% (v/v) Silwet L-77) wurde auf Infloreszenzen von *DRNL::DRNL-GR* in *ap1cal* bzw. *bcm1* oder *AP1/35S::AP1-GR* in *ap1cal A. thaliana* Pflanzen circa fünf Wochen nach Aussaat vor der histologischen Ausprägung von Blüten appliziert. Die nach 2 - 4 bzw. 16 - 20 h Induktion geernteten Infloreszenzen wurden zu 0,8 – 1,5 g pro Probe auf Eis gesammelt. Als Vergleichsprobe wurden zusätzlich Infloreszenzen ohne Dexamethason-Behandlung geerntet. Es folgte eine kovalente Vernetzung der Proteine mit DNA, RNA und anderen Proteinen mit dem „Crosslinker“ Formaldehyd. Dies wurde als erster Schritt mittels Zugabe von 1% (v/v) Formaldehyd zu dem geernteten Pflanzenmaterial sowie einer Inkubation für 30 min auf Eis erreicht. Anschließend wurde das Pflanzenmaterial in flüssigem Stickstoff gefroren und bei -80°C gelagert.

Die Proben wurden für die weitere Verarbeitung mit 25 ml MC-Puffer (100 mM Saccharose, 10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7, 50 mM NaCl) versetzt. Optional konnte ein zusätzlicher „Crosslinker“ eingesetzt werden, um auch eine nicht direkte Bindung von Proteinen an DNA mit einer größeren Entfernung zueinander nachweisen zu können (Zeng et al., 2006). Das ausgewählte EGS (ethylene glycol bis(succinimidyl succinate)) wurde der Probe nach Zugabe von 25 ml MC-Puffer in einer Konzentration von 5 mM zugesetzt. Es folgte eine Inkubation bei Raumtemperatur für 1 h. Als nächster Schritt wurde den Proben Formaldehyd in einer Endkonzentration von 1% (v/v) hinzugefügt. Zur besseren Infiltration des Pflanzengewebes mit Formaldehyd erfolgte eine Inkubation unter Vakuum für 15 min auf Eis. Nach einem Durchmischen der Proben folgte eine erneute Inkubation für 14 min unter Vakuum auf Eis. Ein Abstoppen der Vernetzungsreaktion konnte durch die Zugabe von 2,5 ml 1,25 M Glycin pro Probe erreicht werden. Nach mehrmaligem Invertieren der Proben folgte eine weitere Inkubation für 2 min unter Vakuum auf Eis. Das Pflanzenmaterial wurde anschließend dreimal mit 25 ml MC-Puffer gewaschen, getrocknet sowie in flüssigen Stickstoff aufbewahrt. Nach dem direkten Mörsern in flüssigem Stickstoff wurden die Proben bei -80°C gelagert.

Zu dem gemörserten Pflanzenmaterial wurden 20 ml M1-Puffer (10 mM NaPO<sub>4</sub> pH 7, 100 mM NaCl, 1 M 2-methyl-2,4-pentandiol, 10 mM β-Mercaptoethanol, 1 SigmaFAST Protease Inhibitor Tablette (S8820) auf 50 ml Puffer) hinzugefügt. Der flüssige Bestandteil wurde von den gröberen Pflanzenmaterialresten mittels eines Siebes (100 µm) getrennt und gesammelt. Das Sieb wurde zusätzlich mit 5 ml M1-Puffer gewaschen. Die weitere Isolation der Nuclei sowie die Ultraschallbehandlung zur Fragmentierung des Chromatins erfolgte wie im Protokoll von Kaufmann et al. (2010a) beschrieben. Es wurde der Ultraschall-Desintegrator Sonifier II w-450 von Branson mit den Einstellungen Duty Cycle 80% sowie Output Control 7 für 18 min bei 4°C eingesetzt. Die DNA-Fragmente sollten für eine anschließende Sequenzierung in einem Größenbereich von 200 bis 500 bp liegen. Die verwendeten Protein A-Agarose Kügelchen (sc-2001) wurden von Santa Cruz Biotechnology, Inc. bezogen. Da der Einsatz eines Präimmunserums nicht möglich war, wurden die Proben nach Zugabe des IP-Puffers (50 mM HEPES-Puffer pH 7,5, 150 mM NaCl, 5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,01 mM ZnSO<sub>4</sub>, 1% (v/v) Triton X-100, 1,7 mM SDS) sowie Abnahme der 120 µl Negativ Kontrollproben (NK) 1,5 h bei 4°C auf einem Rotator mit 80 µl Protein A-Agarose Kügelchen inkubiert. Eine spezifische Isolation von Protein-gebundenen DNA-Fragmenten sollte mit dem Einsatz von 1 µg des Glucocorti-



coid Receptor alpha Antibody für das Fusionsprotein DRNL-GR bzw. AP1-GR erreicht werden. Als Vergleichsprobe wurde anstatt des Antikörpers das entsprechende Volumen an Wasser eingesetzt. Die Aufreinigung der DNA-Fragmente erfolgte mit dem MinElute PCR Purification Kit. Das eingesetzte Volumen des Elutionspuffers betrug pro Probe 20 µl.

Die anschließende Sequenzierung wurde am Cologne Center for Genomics der Universität zu Köln durchgeführt (Rehimi et al., 2017). Für die Präparation der DNA-Bibliothek wurde das TruSeq DNA Nano Kit (Illumina) verwendet. Das Protokoll wurde ohne vorherige, zusätzliche Fragmentierung mit dem Reparieren der Enden sowie Polyadenylierung von DNA-Fragmenten und der Ligation von Adaptoren begonnen. Die Amplifikation erfolgte mit 15 bzw. 18 PCR-Zyklen. Die Sequenzierung wurde auf einem Illumina HiSeq 4000 „single end“ (1x51nt) oder „paired end“ (2x76nt) durchgeführt.

#### **2.2.14 Genom-weite Sequenzierung von offenem Chromatin**

Modifikationen der ATAC-Seq nach Buenroostro et al. (2015) resultierten aus der Verwendung von *ap1cal DRNL::erGFP* Infloreszenzen, die Zellen wurden protoplastiert sowie anhand ihrer GFP-Expression getrennt. Die 95.000 – 300.000 in 10 ml FACS-Medium gesammelten Protoplasten wurden zentrifugiert (500 rpm, 10 min, 4°C) sowie in 500 µl FACS-Medium resuspendiert. Nach einer Wiederholung des Zentrifugationsschritts sowie der erneuten Resuspension in 500 µl FACS-Medium folgte die Zugabe eines Lysepuffers (10 mM NaCl, 10 mM TrisHCl pH 7,4, 3 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1% (v/v) IGEPAL CA-630) mit anschließender Inkubation auf Eis für 30 min. Die lysierten Zellen wurden zuerst für 10 min sowie in einem zweiten Schritt für zusätzliche 2 min zentrifugiert (1.000 g, 4°C), um den Überstand möglichst restlos zu entfernen. Mittels Zugabe von 15 µl Nuklease-freiem H<sub>2</sub>O, 25 µl Tagment DNA Puffers sowie 10 µl des Tagment DNA Enzyms (Nextera DNA Library Preparation Kit von Illumina; Kat.-Nr.: FC-121-1030) konnte die Integration von Adaptoren in das offene Chromatin während einer Inkubation bei 37°C für 30 min erreicht werden. Im Anschluss wurden die Proben direkt mit dem MinElute PCR Purification Kit aufgereinigt.

Die anschließende Sequenzierung wurde am Cologne Center for Genomics der Universität zu Köln durchgeführt. In einem ersten Schritt wurden die Fragmente in 12 bzw. 15 PCR-Zyklen mit Reagenzien des Illumina TruSight One Library Preparation Kit amplifiziert, um Indices und allgemeine Adaptoren für die Generierung von Clustern zu integrieren. Nach der Aufreini-

gung mittels Beckman Coulter Ampure XP Beads (Kat.-Nr.: NC9933872) sowie Quantifizierung mittels KAPA Library Quantification kit (Peqlab) wurden die Fragmente auf einer 2200 TapeStation (Agilent Technologies) überprüft und mittels KAPA Library Quantification kit (Peqlab) und den 7900HT Sequence Detection System (Applied Biosystems) quantifiziert. Die Sequenzierung erfolgte auf einem Illumina HiSeq4000 Sequenzierer mit dem 2x75nt paired end Protokoll.

## **2.2.15 Bioinformatische Auswertung der Rohdaten von genomweiten Sequenzierungen**

### **RNA-Seq**

Die Prozessierung der Rohdaten, die Zuordnung der sequenzierten RNA-Fragmente zu den korrespondierenden *A. thaliana* Genomdaten (TAIR10; [ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Genes/TAIR10\\_genome\\_release](ftp://ftp.arabidopsis.org/home/tair/Genes/TAIR10_genome_release)) sowie die Erstellung der Hauptkomponentenanalyse erfolgte unter Verwendung des QuickNGS Systems (Wagle et al., 2015) in der bioinformatischen Abteilung des Exzellenzcluster Cellular Stress Responses in Aging-Associated Diseases unter der Leitung von Dr. Peter Frommolt (Frerichs et al., 2016). Berechnungen wurden mit den Programmen DeSeq2 (Love et al., 2014) bzw. Cufflinks (Trapnell et al., 2012) durchgeführt. Sofern nicht anders erwähnt, wurde für weitere Analysen in dieser Arbeit mit den Ergebnissen aus DeSeq2 gearbeitet, welches die Transkriptmengen als Fragmente normalisiert zur Länge eines Gens pro Million („Fragments Per Kilobase Million“; FPKM) ausgibt.

### **ChIP-Seq**

Die bioinformatische Auswertung der ChIP-Seq Rohdaten wurde von Dr. Julia Engelhorn (Universität von Warwick, UK) übernommen. Die Verankerung der erhaltenen DNA-Fragmente erfolgte auf das *A. thaliana* Genom nach TAIR10. Zur Identifikation von potentiellen Peaks in einer Probe wurde das Programm MACS (Zhang et al., 2008) mit einer Genomgröße von  $1,2 \times 10^8$  verwendet. Weitere Voreinstellungen wurden nicht verändert.

### **ATAC-Seq**

Die bioinformatische Auswertung der Rohdaten wurde von Dr. Julia Engelhorn (Universität von Warwick, UK) durchgeführt (unveröffentlichte Daten). Für eine Zuordnung der sequenzierten Fragmente zum *A. thaliana* Genom diente TAIR10 als Referenz. Identische Fragmente ebenso wie DNA-Sequenzen von Chloroplasten oder Mitochondrien wurden verworfen. Zur

Identifizierung von Chromatinregionen, die eine Zugänglichkeit für die Transposase aufwiesen, wurde die Funktion SICER-df-rb des Programms SICERV V1.1 (Zang et al., 2009) genutzt. Es wurde jeweils ein Wert für die effektive Genomgröße (0,9), der e-Wert für angereicherte Regionen nach ATAC-Seq (100) und der p-Wert für die Identifizierung von Regionen mit unterschiedlich hoher Zugänglichkeit (0,0001) gesetzt. Für eine Visualisierung der Daten wurden diese in GBrowse geladen sowie Heatmaps generiert (Engelhorn et al., 2017). Für die Darstellung der Tn5 Transposase Schnittpunkte wurde eine Korrektur, wie in Buenrostro et al. (2013) beschrieben, durchgeführt.

Gene mit THSs bzw. dTHSs sind im Anhang B 8.2 aufgeführt.

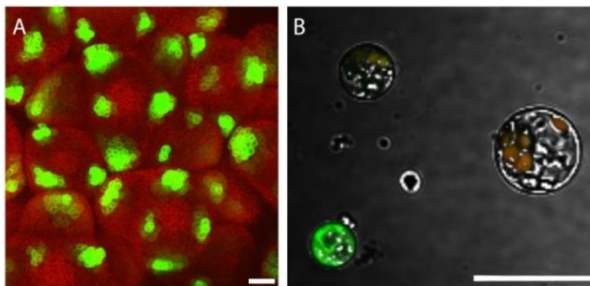
#### **2.2.16 Funktionelle Zuordnung von Genen in ein Gen-Ontologie Netzwerk**

Gen-Ontologie (GO) Netzwerke wurden mittels des Programms Biological Networks Gene Ontology tool (BiNGO, Maere et al., 2005) erstellt und auf Cytoscape (Shannon et al., 2003) visualisiert. Für eine funktionelle Zuordnung der Gene in GO-Gruppen wurde eine Datei mit Informationen über die annotierten Gene des *A. thaliana* Genoms von der Internetseite <http://geneontology.org> (20. Juni 2015) als Referenz genutzt. Die Einstellung GOSlim\_Plants sowie der Fokus auf das Netzwerk Biologischer Prozess gewähren eine möglichst übersichtliche Darstellung der Daten. GO-Gruppen mit einer signifikant (p-Wert  $\leq 0,05$  bzw.  $\leq 0,01$ ) erhöhten Anzahl an Genen gegenüber einer statistischen Verteilung wurden entsprechend ihrem p-Wert farblich markiert. Um die Zahl der falsch Positiven zu reduzieren, erfolgte eine Korrektur nach Benjamini und Hochberg (Benjamini und Yekutieli, 2001). Eine Mehrfachnennung eines Gens in verschiedenen GO-Gruppen ist möglich. Das Programm BiNGO beschriftet automatisch die einzelnen GO-Gruppen mit englischen Begriffen, diese wurden zum Teil, um eine bessere Übersicht zu erreichen, durch deutsche Abkürzungen ersetzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 Sortierung von Zellen anhand ihrer Fluoreszenzemission

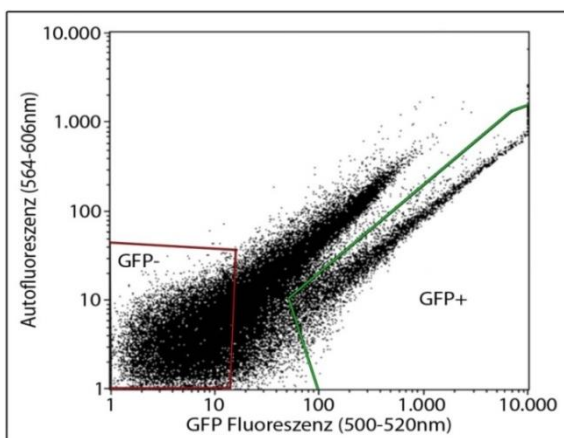
Zellen aus dem *DRNL::erGFP ap1cal* Infloreszenzmeristem (Abbildung 2A) wurden für eine nachfolgende fluoreszenzabhängige Sortierung (FACS) protoplastiert und vereinzelt (Abbildung 2B).



**Abbildung 2: Zellen des *ap1cal* Infloreszenzmeristems**

Zellen des *ap1cal* Infloreszenzmeristems mit dem Transgen *DRNL::erGFP* (A) wurden protoplastiert (B) und anhand ihrer Fluoreszenzemission sortiert. Der Maßstab beträgt 20 µm.

Die Detektion der GFP-Fluoreszenzemission sowie der Autofluoreszenz der Chloroplasten von vereinzelt Protoplasten ermöglicht die Trennung der GFP-exprimierenden (GFP+) von den GFP-nicht exprimierenden (GFP-) Protoplasten (Abbildung 3), sodass in nachfolgenden Versuchen zwischen Zellen mit einem aktiven bzw. inaktiven *DRNL*-Promotor verglichen werden kann. Der Anteil an gesammelten GFP+ Zellen beläuft sich auf circa 5 – 10% aller sortierten Protoplasten, diese Zellen bilden damit eine Minderheit des *ap1cal* Infloreszenzmeristems.



**Abbildung 3: Darstellung der mittels FACS-Vorteil SE sortierten Protoplasten**

Die Protoplasten wurden anhand der GFP-Fluoreszenzemission bei 500 – 520 nm sowie der Autofluoreszenz ihrer Chloroplasten (564 – 606 nm) sortiert. Die für GFP+ (grün) und GFP- (rot) markierten Zellen wurden gesammelt und analysiert.

**Tabelle 1: GFP-Transkripte in GFP+ und GFP– Zellen von vier biologischen Replikaten**

Anzahl an GFP-Transkripten in vier biologischen Replikaten sowie als Mittelwert der biologischen Replikate im Vergleich von GFP+ und GFP– Zellen

Biologische Replikate	GFP–	GFP+
1	21	1.433
2	4	983
3	6	1.926
4	16	1.012
Mittelwert	11,75	1.338,5

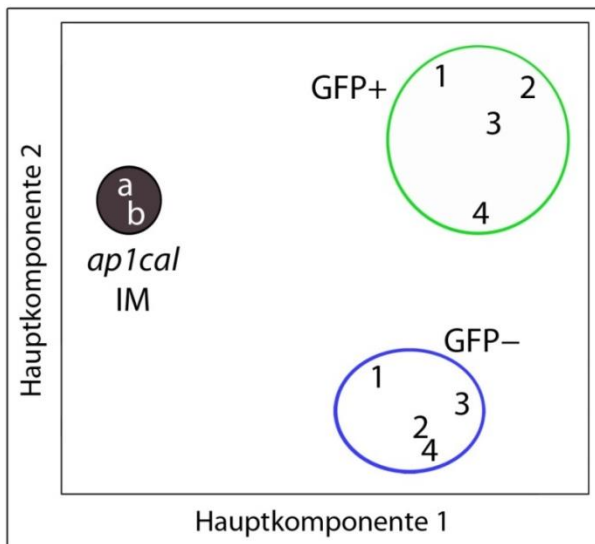
Die geringe Anzahl an GFP-Transkripten in den GFP– Zellen bzw. die Anreicherung in GFP+ Zellen (Tabelle 1) bestätigt die erfolgreiche Trennung der GFP+ und GFP– Zellen in vier biologischen Replikaten.

### 3.2 Genexpression im Sprossapikalmeristem

Nach einer Trennung der protoplastierten Gründerzellen von den restlichen Zellen des *ap1cal* Infloreszenzmeristems (IMs) von *A. thaliana* anhand ihrer Fluoreszenzemission wurde die RNA isoliert. Die anschließende Umwandlung in cDNA mittels reverser Transkription sowie eine Hochdurchsatz-Sequenzierung (RNA-Seq) ermöglicht die Analyse des Transkriptoms von GFP+ bzw. GFP– Zellen. Im Vergleich der beiden Zelltypen können signifikant ( $p \leq 0,01$ ) differenziell regulierte Gene identifiziert werden, die entweder höhere Transkriptmengen in GFP+ gegenüber GFP– Zellen (hochreguliert) bzw. niedrigere Transkriptlevel in GFP+ als in GFP– Zellen (herunterreguliert) aufweisen. Zur Detektion von möglichen Veränderungen in der Transkription aufgrund des Sortierens wurde zusätzlich RNA aus nicht protoplastierten Infloreszenzmeristemen isoliert und sequenziert. Als Maß der Genexpression wurden die „steady state“ Transkriptmengen, ermittelt als FPKM („fragments per kilobase of exon per million reads mapped“), miteinander verglichen. Diese resultieren, falls nicht anders erwähnt, aus dem Programm DeSeq2 und beschreiben die Anzahl der Fragmente normalisiert zur Länge eines Gens pro Million als einen Wert für die biologischen Replikate. Die hier gezeigten Auswertungen fokussieren sich auf die nuklearen Gene, d.h. 133 Chloroplasten- bzw. 146 Mitochondriengene wurden ignoriert. Unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/> können die Daten mit dem Zugriffsschlüssel GSE81401 eingesehen werden.

### 3.2.1 Distinkte Transkriptome in verschiedenen Zelltypen

Der Grad an Übereinstimmung von verschiedenen Proben wurde mittels Hauptkomponentenanalyse untersucht. Die vier bzw. zwei biologischen Replikate von GFP+ und GFP– Zellen bzw. von unprotoplastierten Zellen des IMs (*ap1cal* IM) sind jeweils dicht beisammen gruppiert (Abbildung 4). Im Gegensatz dazu sind die Transkriptome der verschiedenen Zelltypen distinkt voneinander abgegrenzt.



**Abbildung 4: Hauptkomponentenanalyse der Genexpression**

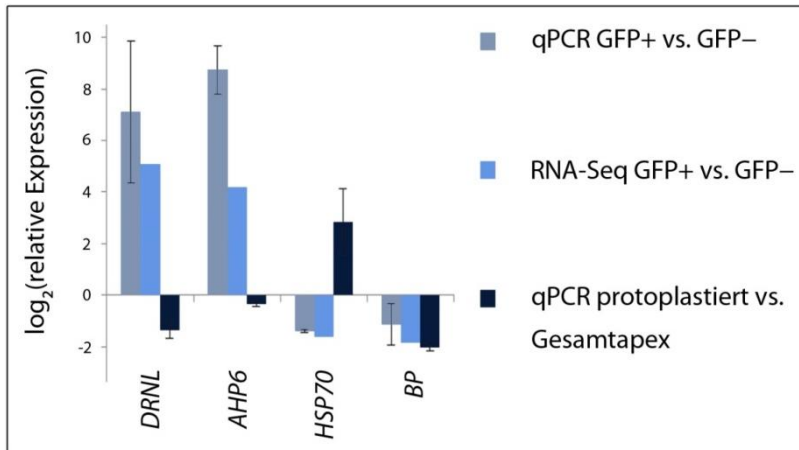
Die Hauptkomponentenanalyse zeigt den Grad an Übereinstimmung zwischen vier biologischen Replikaten von GFP+ und GFP– Zellen sowie zwei des *ap1cal* IMs. Die Berechnungen erfolgten anhand der logarithmierten ( $\log_2$ ) FPKM aus dem Programm cufflinks.

### 3.2.2 Überprüfung der RNA-Seq Ergebnisse mittels qPCR sowie der Wirkung des Protoplastierens auf die Genexpression

Die RNA-Seq Ergebnisse wurden exemplarisch an ausgewählten Genen mittels qPCR überprüft. Die Transkriptmengen wurden in GFP+ Zellen im Verhältnis zu GFP– Zellen sowie bei vier Genen zusätzlich im Vergleich von unsortierten Protoplasten gegenüber nicht protoplastierten Infloreszenzmeristemzellen (Gesamtapex) untersucht. Die Auswahl umfasst hoch- und herunterregulierte Gene, darunter *DRNL*, Gene mit Beteiligung an der Blütenentwicklung sowie Gene involviert in der Stressantwort.

*DRNL* und *AHP6* weisen eine höhere Anzahl an Transkripten sowohl nach RNA-Seq als auch qPCR in GFP+ gegenüber GFP– Zellen auf (Abbildung 5). Im Vergleich der protoplastierten Zellen zum unbehandelten Gesamtapex ergibt sich ein negativer Wert für die relative Expression dieser beiden Gene, die Genexpression ist also aufgrund des Protoplastierens

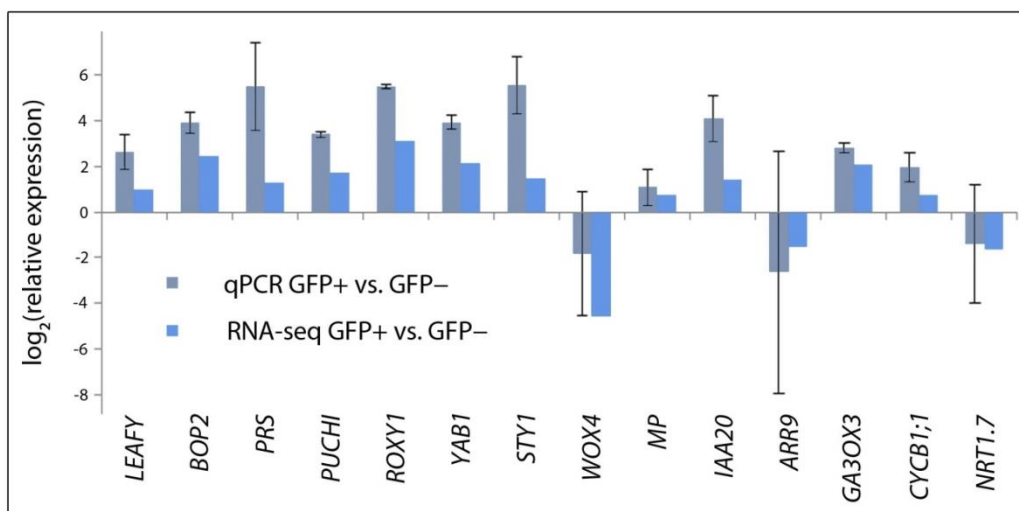
reduziert. Im Gegensatz dazu konnten bei den Genen kodierend für das Hitzeschock Protein HSP70 (AT3G12580) und *BP* eine höhere Transkriptmenge in GFP– als in GFP+ Zellen festgestellt werden. *BP* zeigt, ähnlich wie *DRNL* und *AHP6*, eine verminderte Genexpression nach dem Protoplastieren. *HSP70* hingegen wird in protoplastierten Zellen gegenüber unprotoplastierten Zellen verstärkt transkribiert.



**Abbildung 5: Transkriptmengen nach RNA-seq bzw. qPCR von *DRNL*, *AHP6*, *HSP70* und *BP***

Die relative Expression von *DRNL*, *AHP6*, *HSP70* und *BP* ist als  $\log_2$ -Wert im Vergleich von GFP+ gegenüber GFP– Zellen nach qPCR (grau) bzw. nach RNA-seq (blau) sowie von unsortierten Protoplasten gegenüber dem unprotoplastierten Gesamtapex nach qPCR (schwarz) aufgetragen. Die Standardabweichung der qPCR Werte resultieren aus zwei bis drei biologischen Replikaten. Die RNA-seq Daten stammen aus einer DeSeq2 Analyse, dieses Programm ermittelte einen Wert für das Transkriptlevel aus den vier biologischen Replikaten, daher konnte hier keine Standardabweichung berechnet werden.

Die in Abbildung 6 gezeigten 14 Gene sind unter anderem an der Blütenentwicklung, der Erhaltung der Stammzellpopulation, im Auxinsignalweg oder der Zellzykluskontrolle beteiligt.



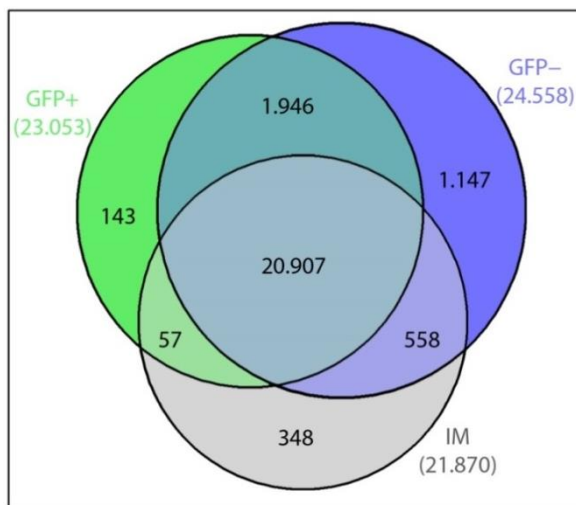
**Abbildung 6: Transkriptmengen von 14 Genen im Vergleich von RNA-Seq und qPCR**

Die relative Expression der ausgewählten Gene ist als  $\log_2$ -Wert im Vergleich von GFP+ gegenüber GFP– Zellen nach qPCR (grau) bzw. nach RNA-Seq (blau) aufgetragen. Die Standardabweichung der qPCR Werte resultieren aus zwei bis drei biologischen Replikaten.

Eine mittels RNA-Seq festgestellte Hoch- bzw. Herunterregulation der Genexpression im Vergleich von GFP+ zu GFP– Zellen konnte für jedes Gen mittels qPCR bestätigt werden. Die Transkriptmengen von *DRNL*, *AHP6* und *BP* sind aufgrund des Protoplastierens reduziert, *HSP70* wird im Gegensatz nach Stress hochreguliert.

### 3.2.3 Genexpression in GFP+ und GFP– Zellen im Vergleich zum IM

Von den 28.496 (TAIR10) in *A. thaliana* transkribierten Genen werden 21.870 (Abbildung 7) in nicht-protoplastierten Zellen des IMs exprimiert (FPKM  $\geq 1$ ). Im Vergleich dazu ist die Anzahl an transkribierten Genen in GFP+ (23.053) bzw. GFP– Zellen (24.558) erhöht. Ein Großteil (20.907) der Gene konnte in jeder der drei Kategorien identifiziert werden, einige Gene werden jedoch spezifisch in einer bzw. in zwei der drei Zelltypen/Gewebe transkribiert. Insgesamt unterscheidet sich das Transkriptom der GFP– Zellen bei FPKM  $\geq 1$  am stärksten von den anderen beiden Zelltypen und hat mit 1.147 spezifisch exprimierten Genen 3,2-mal mehr als das IM bzw. 8-mal mehr als die GFP+ Zellen.



**Abbildung 7: Genexpression in GFP+ und GFP– Zellen im Vergleich zu unprotoplastierten Infloreszenzmeristemzellen**

Die hier betrachteten nuklearen Gene haben einen FPKM  $\geq 1$ . Die Anzahl an exprimierenden Genen wird von GFP+ (grün) und GFP– (blau) im Verhältnis zum unprotoplastierten IM (grau) dargestellt.

Im Vergleich von GFP+ bzw. GFP– Zellen gegenüber den IM-Zellen (Tabelle 2) werden 12.264 bzw. 11.460 Gene differenziell transkribiert ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ). Bei einem zusätzlich zum  $p$ -Wert gesetzten Grenzwert, der beschreibt um welchen Faktor sich der FPKM der beiden Proben unterscheidet (FC), reduzieren sich diese Zahlen. In jeder der drei Kategorien zeigt GFP+ im Vergleich zu den IM-Zellen eine höhere Anzahl an differenziell exprimierten Genen als GFP–.



**Tabelle 2: Anzahl an differenziell transkribierten, nuklearen Genen in GFP+ bzw. GFP– Zellen im Vergleich zu unprotoplastierten Infloreszenzmeristemzellen**

Differenziell transkribierte Gene in GFP+ bzw. GFP– Zellen im Vergleich zu Infloreszenzmeristemzellen (IM) bei einem p-Wert von mindestens 0,01 sowie zusätzlich einem FC  $\geq 1,5$  bzw. 2.

	differenziell transkribierte Gene		
	p-Wert $\leq 0,01$	p-Wert $\leq 0,01$ ; FC $\geq 1,5$	p-Wert $\leq 0,01$ ; FC $\geq 2$
<b>GFP+ zu IM</b>	12.264	10.471	7.864
<b>GFP– zu IM</b>	11.460	9.581	6.957

Die Anzahl an transkribierten Genen in den GFP+ sowie GFP– Zellen ist vermutlich aufgrund von Stress durch das Protoplastieren sowie Sortieren gegenüber dem IM erhöht. In einer funktionellen Zuordnung der spezifisch in GFP+ sowie GFP– Zellen gegenüber dem IM transkribierten Gene in Ontologie (GO-) Gruppen mittels BiNGO konnte nur eine überrepräsentierte Kategorie („Pollination“) und nicht die erwarteten Stress-assoziierten Gruppen ermittelt werden. Abhängig von dem gesetzten FPKM- bzw. FC-Grenzwert weisen entweder GFP– oder GFP+ Zellen größere Unterschiede zum IM auf.

### 3.2.4 Gemeinsamkeiten und Unterschiede in der Genexpression von GFP+ und GFP– Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem

Für eine genauere Analyse der Unterschiede zwischen GFP+ bzw. GFP– Zellen und dem IM werden im Folgenden die exprimierten Gene (FPKM  $\geq 1$ ), die im Vergleich zum IM auch eine differenzielle Regulation ihrer Genexpression erfahren (FC  $\geq 1,5$ ; p-Wert  $\leq 0,01$ ), näher betrachtet. 7,3% der 1.147 Gene, die nur in GFP– Zellen exprimiert werden, bzw. 1,4% der 143 nur in GFP+ Zellen exprimierten Gene weisen einen FC  $\geq 1,5$  auf. Im Vergleich zum IM werden circa 10.000 Gene in den GFP+ bzw. GFP– Zellen differenziell reguliert (Tabelle 3).

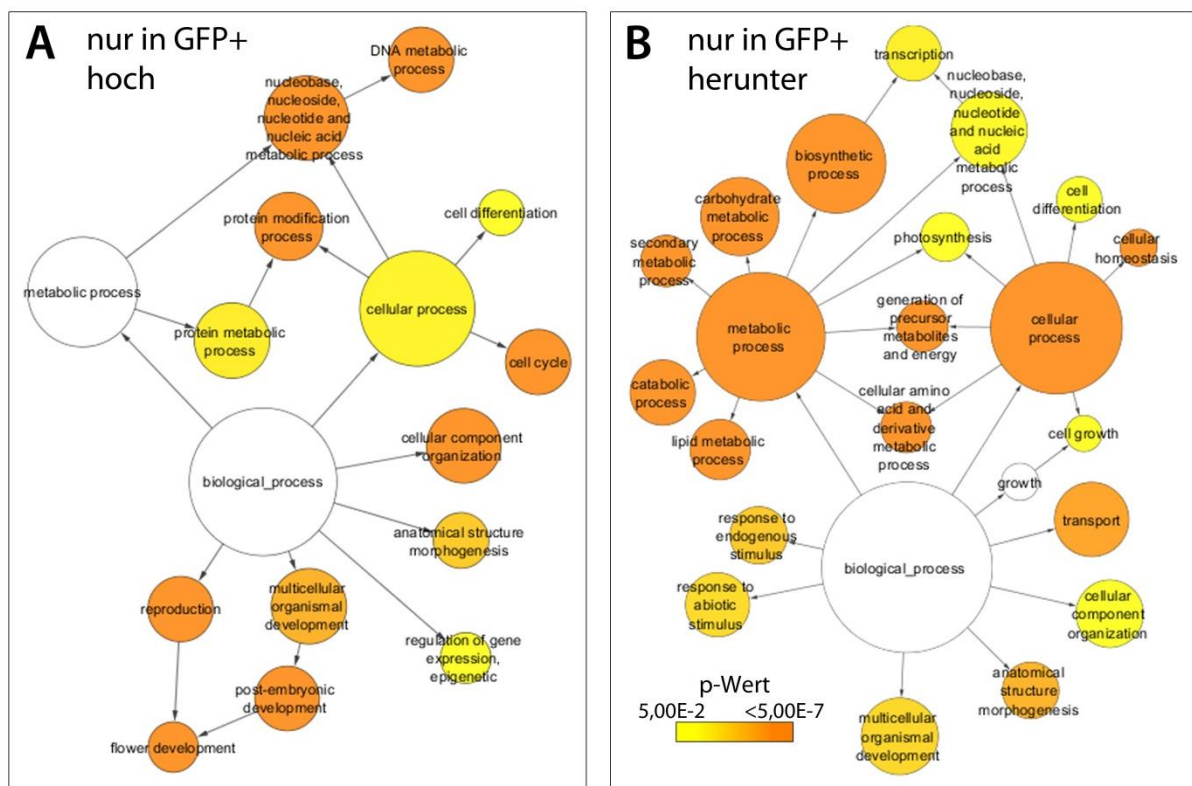
**Tabelle 3: Anzahl an Genen, die in GFP+ bzw. GFP– im Vergleich zum Infloreszenzmeristem (IM) hoch- bzw. herunterreguliert sind**

	Anzahl an Genen mit FPKM $\geq 1$ ; FC $\geq 1,5$ ; p-Wert $\leq 0,01$	
	GFP+ zu IM	GFP– zu IM
<b>hochreguliert</b>	5.726	6.260
<b>herunterreguliert</b>	4.746	3.321

Eine funktionelle Einordnung dieser differenziell transkribierten Gene zeigt hohe Übereinstimmungen in den GO-Netzwerken der in den GFP+ und GFP– Zellen gegenüber dem IM ähnlich regulierten Gene. Das bedeutet, dass sowohl die in den GFP+ sowie GFP– Zellen hochregulierten Gene (Anhang A 7.2, Abbildung 28) bzw. herunterregulierten Gene



Eine Zuordnung dieser gemeinsamen Gene in funktionelle GO-Gruppen zeigt eine ähnliche Verteilung wie das Netzwerk aller hoch- und herunterregulierten Gene in GFP+ und GFP- Zellen (Anhang A 7.2, Abbildung 29). Zusätzlich gibt es Gene die ausschließlich in GFP+ (nur GFP+) oder GFP- Zellen (nur GFP-) gegenüber dem IM differenziell transkribiert werden (Tabelle 4). Die GO-Gruppen der Gene, die nur in GFP+ Zellen herunterreguliert werden (Abbildung 9B), sind ähnlich zu den Kategorien der in GFP+ sowie GFP- Zellen herunterregulierten Gene (Anhang A 7.2, Abbildung 29). Spezifisch in GFP+ Zellen werden Gene hochreguliert (Abbildung 9A), die mit der Blütenentwicklung assoziiert werden. GO-Gruppen mit Bezug auf eine Reizantwort sowie Transkription werden im Gegensatz dazu nicht angezeigt.



**Abbildung 9: GO-Netzwerk von Genen, die nur in GFP+ Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem differenziell transkribiert werden**

Eine Zuordnung der nur in GFP+ Zellen hoch- (A) bzw. herunterregulierten (B) Gene im Vergleich zum Infloreszenzmeristem erfolgte mittels BiNGO. Eine statistische Überrepräsentation an Genen in einer GO-Gruppe wird bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant angesehen und farblich markiert.

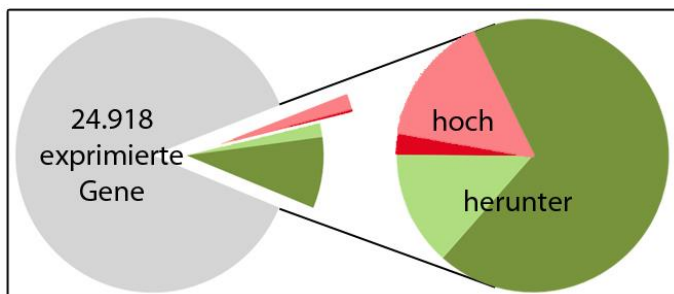
Das GO-Netzwerk der nur in GFP- Zellen hochregulierten Gene zeigt nur vier überrepräsentierte GO-Gruppen (Anhang A 7.2, Abbildung 30A). Im Gegensatz dazu können die spezifisch in GFP- Zellen herunterregulierten Gene fünfmal mehr signifikante GO-Gruppen (Anhang A 7.2, Abbildung 30B) zugeordnet werden. Die GO-Gruppen der nur in GFP- Zellen herunterregulierten Gene weisen eine hohe Übereinstimmung mit dem Netzwerk der nur in GFP+ hoch-

regulierten Gene auf. Alle GO-Gruppen der nur in GFP+ hochregulierten Gene treten auch in dem BiNGO-Netzwerk der nur in GFP– Zellen herunterregulierten Gene auf, obwohl sich die beiden Datensets in nur sechs Genen überschneiden.

Aufgrund des Protoplastierens sowie Sortierens der Zellen verändern sich die Transkriptlevel von Genen in den GFP+ sowie GFP– Zellen im Vergleich zum IM, unter anderem werden Blütenentwicklungsgene herunterreguliert bzw. Stressgene hochreguliert. Obwohl von vielen Genen die Transkription in den sortierten Protoplasten im Vergleich zum IM ähnlich reguliert wird, gibt es dennoch auch Unterschiede im Transkriptom der GFP+ und GFP– Zellen. Die funktionelle Zuordnung in GO-Gruppen zeigt, dass GFP+ Zellen weniger stark auf Stress reagieren als die GFP– Zellen, dafür werden auch weiterhin Gene transkribiert, die eine Rolle in der Blütenentwicklung spielen.

### 3.2.5 Direkter Vergleich der Genexpression von GFP+ zu GFP– Zellen

Im direkten Vergleich von GFP+ zu GFP– Zellen (Abbildung 10) werden 24.918 nukleare Gene transkribiert ( $\text{FPKM} \geq 1$ ). Ein Teil davon weist eine signifikant unterschiedliche Genexpression zwischen den beiden Zelltypen auf.



**Abbildung 10: Transkribierte Gene in GFP+ und GFP– Zellen**

Ein Teil aller exprimierten Gene ( $\text{FPKM} \geq 1$ ) in GFP+ oder GFP– Zellen (grau) wird zwischen den beiden Zelltypen signifikant ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ) differenziell transkribiert. Eine höhere Transkriptmenge in GFP+ Zellen bei einem FC  $\geq 1,5$  ist rot markiert, die Gene mit einer um einen FC von mindestens 2 unterschiedlichen Genexpression sind anteilig in dunkelrot dargestellt. Entsprechend für die herunterregulierten Gene in GFP+ gegenüber GFP– werden die differenziell transkribierten Gene mit einem FC  $\geq 1,5$  (hell- und dunkelgrün) bzw. 2 (dunkelgrün) gezeigt.

Bei einem FC von mindestens 1,5 werden 717 Gene hochreguliert, im Gegensatz dazu werden fast fünfmal (3.356) so viele Gene herunterreguliert (Tabelle 5). Ein strikterer FC ( $\geq 2$ ) reduziert die Anzahl an hochregulierten Genen um den Faktor 6,6 bzw. an herunterregulierten Genen um 16,5% auf 2.801.

**Tabelle 5: Differenziell transkribierte Gene im Vergleich von GFP+ zu GFP– Zellen**

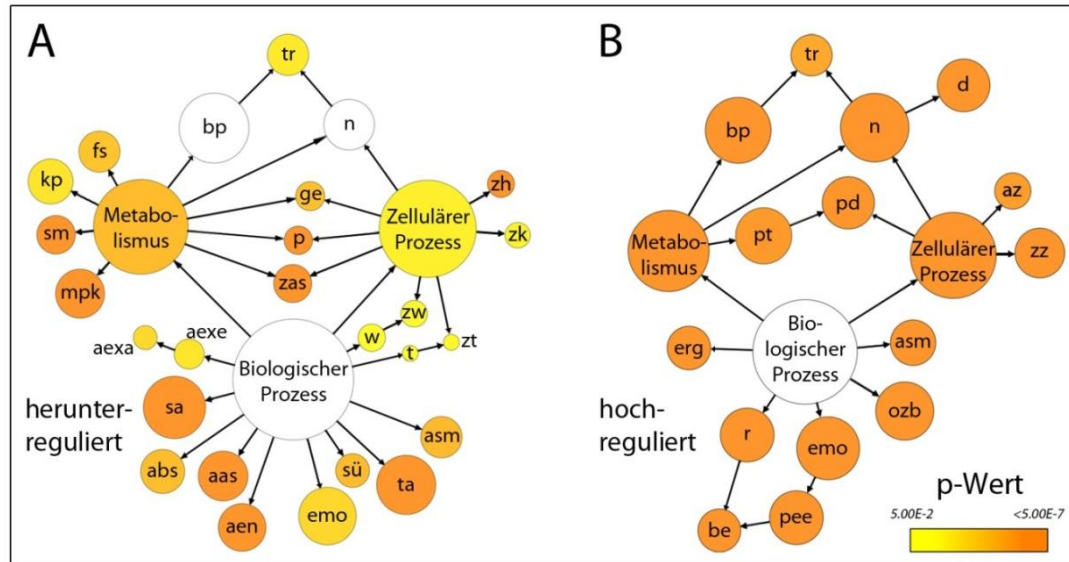
Die Anzahl an Genen, die in GFP+ und GFP– Zellen signifikant ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ) mit einem  $FC \geq 1,5$  bzw. 2 differenziell exprimiert werden, wird im Vergleich von hoch- und herunterregulierten Genen dargestellt.

differenziell transkribierte Gene		
	$FC \geq 1,5; p\text{-Wert} \leq 0,01$	$p\text{-Wert} \leq 0,01; FC \geq 2$
hochreguliert	717	109
herunterreguliert	3.356	2.801

Um Gene wie z. B. MP ( $FC = 1,67$ ) in die weiteren Datenanalysen mit einzubeziehen, werden im Folgenden die nuklearen Gene mit einem  $FC \geq 1,5$  bei einem  $p\text{-Wert} \leq 0,01$  betrachtet. Herunterregulierte Gene sind durch einen negativen FC gekennzeichnet.

### 3.2.6 Einordnung von differenziell regulierten Genen in Gen-Ontologie Gruppen

Die funktionelle Einordnung von differenziell regulierten Genen im direkten Vergleich von GFP+ und GFP– Zellen in Gen-Ontologie (GO) Gruppen erfolgt mittels BiNGO. Die GO-Netzwerke der herunterregulierten Gene bzw. der hochregulierten Gene sind in Abbildung 11 dargestellt. Die vollständigen Bezeichnungen der GO-Gruppen sowie die Anzahl an Genen in der jeweiligen Kategorie sind in Tabelle 6 aufgelistet.



**Abbildung 11: Zuordnung der hoch- und herunterregulierten Gene in Gen-Ontologie (GO) Gruppen**

Die Einordnung in GO-Gruppen erfolgte mittels BiNGO für herunter- (A) bzw. hochregulierte (B) Gene ( $FC \geq 1,5; p\text{-Wert} \leq 0,05$ ) im direkten Vergleich von GFP+ und GFP– Zellen. Eine im Vergleich zu einer statistischen Verteilung erhöhte Anzahl an Genen in einer GO-Gruppe wird bei einem  $p\text{-Wert} \leq 0,05$  als signifikant angesehen und farblich markiert. Die englische Beschriftung der einzelnen GO-Gruppen, generiert mittels BiNGO, wurde für eine bessere Übersicht durch Abkürzungen ersetzt.

**Tabelle 6: GO-Gruppen der herunter- und hochregulierten Gene mit der jeweiligen Genanzahl**

Auflistung der GO-Gruppen, die eine signifikante (p-Wert  $\leq 0,05$ ) erhöhte Anzahl an herunter- bzw. hochregulierten Genen aufweisen, mit ihrer vollständigen Bezeichnung sowie der totalen Anzahl bzw. dem prozentualen Anteil an Genen

Herunterregulierte Gene				Hochregulierte Gene			
GO Gruppe		Anzahl an Genen	Anteil [%]	GO Gruppe		Anzahl an Genen	Anteil [%]
asm	Anatomische Struktur Morphogenese	251	3,11	asm	Anatomische Struktur Morphogenese	101	3,38
aas	Antwort auf abiotischen Stimulus	379	4,70	-	Biologischer Prozess	2.988	100
abs	Antwort auf biotischen Stimulus	289	3,59	az	Ausdifferenzierung von Zellen	58	1,94
aen	Antwort auf endogenen Stimulus	346	4,29	be	Blütenentwicklung	88	2,95
aexe	Antwort auf externen Stimulus	121	1,50	bp	Biosynthetischer Prozess	237	7,93
aexa	Antwort auf extrazellulären Stimulus	69	0,86	d	DNA Metabolismus	143	4,79
-	Biologischer Prozess	8.613	100	emo	Entwicklung von multizellulären Organismen	214	7,16
bp	Biosynthetischer Prozess	-	-	erg	Epigenetische Regulation der Genexpression	91	3,05
emo	Entwicklung von multizellulären Organismen	520	6,45	-	Metabolismus	378	12,65
fs	Fettstoffwechsel	248	3,08	n	Nukleinbase, Nukleosid, Nukleotid und Nukleinsäure Metabolismus	260	8,70
ge	Generierung von Vorläufer für Metaboliten und Energie	112	1,39	ozb	Organisation von zellulären Bestandteilen	179	5,99
kp	Katabolischer Prozess	303	3,76	pee	Postembryonische Entwicklung	150	5,02
mpk	Metabolismus der Kohlenhydrate	366	4,54	pd	Protein Modifikation	140	4,69
-	Metabolismus	1.506	18,69	pt	Protein Metabolismus	165	5,52
n	Nukleinbase, Nukleosid, Nukleotid und Nukleinsäure Metabolismus	-	-	r	Reproduktion	150	5,02
p	Photosynthese	105	1,30	tr	Transkription	80	2,68
sa	Stressantwort	618	7,67	-	Zellulärer Prozess	429	14,36
sm	Sekundärer Metabolismus	214	2,66	zz	Zellzyklus	125	4,18
sü	Signalübertragung	159	1,97				
t	Tod	24	0,30				
ta	Transport	554	6,87		Gesamtanzahl an Genen	2.988	
tr	Transkription	250	3,10				
w	Wachstum	97	1,20				
zas	Zellulärer Aminosäure- und derivativer Stoffwechsel	208	2,58				
zh	Zelluläre Homöostasis	94	1,17				
zk	Zellkommunikation	81	1,01				
-	Zellulärer Prozess	1.585	19,67				
zt	Zelltod	24	0,30				
zw	Zellwachstum	90	1,12				
	Gesamtanzahl an Genen	8.613					

Die 3.356 herunterregulierten Gene (Abbildung 11A) verteilen sich auf insgesamt 29 GO-Gruppen, von denen 26 eine signifikant erhöhte Anzahl an Genen aufweisen. Charakteristische Kategorien der herunterregulierten Gene sind häufig mit der Antwort auf einen Reiz oder allgemeine zelluläre Prozesse wie Zellhomöostase oder Photosynthese assoziiert. Die 18 GO-Gruppen der 717 hochregulierten Gene (Abbildung 11B) weisen generell eine deutlich höhere Signifikanz auf als die der herunterregulierten Gene. Im Unterschied zu den herunterregulierten Genen treten im BiNGO-Netzwerk der hochregulierten Gene die GO-Gruppen

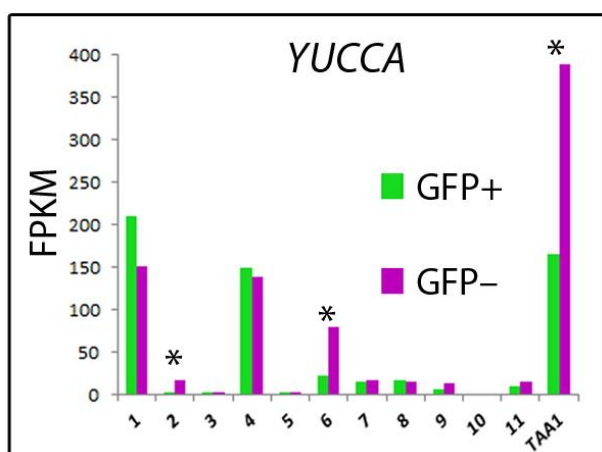
der Blütenentwicklung sowie des Zellzyklus jedoch keine, die mit einer Stressantwort assoziiert sind, auf.

Die hoch- bzw. herunterregulierten Gene werden durch unterschiedliche GO-Gruppen repräsentiert, sie überschneiden sich nur in drei Kategorien wie z. B. Transkription. Das GO-Netzwerk der hochregulierten Gene ist geprägt durch Blütenentwicklung und Zellzyklus bzw. der herunterregulierten Gene durch die Reaktion auf Stress.

### 3.2.7 Veränderungen in der Aktivität von Genen der Biosynthese- und Signalwege von Auxin

Da *DRNL* in Gründerzellen des Infloreszenzmeristems von *A. thaliana* exprimiert wird und Phytohormone wie Auxin eine Rolle bei Wachstum und Ausdifferenzierung von Zellen spielen, werden die Transkriptmengen von Genen, die in Biosynthese- bzw. Signalwegen dieses Phytohormons involviert sind, näher untersucht.

Die meisten Gene des Auxinbiosyntheseweges mit IPA als Zwischenstufe weisen sowohl in GFP+ als auch in GFP- Zellen eine niedrige Genaktivität auf (Abbildung 12). Die vier Gene *YUC1*, 4, 6 und *TRYPTOPHAN AMINOTRANSFERASE OF ARABIDOPSIS 1 (TAA1)* werden stärker als die übrigen Gene exprimiert, von denen nur *YUC6* und *TAA1* einen signifikanten Unterschied zwischen den beiden Zelltypen zeigen. In beiden Fällen werden die Gene stärker ( $FC \geq 2$ ) in GFP- Zellen exprimiert.

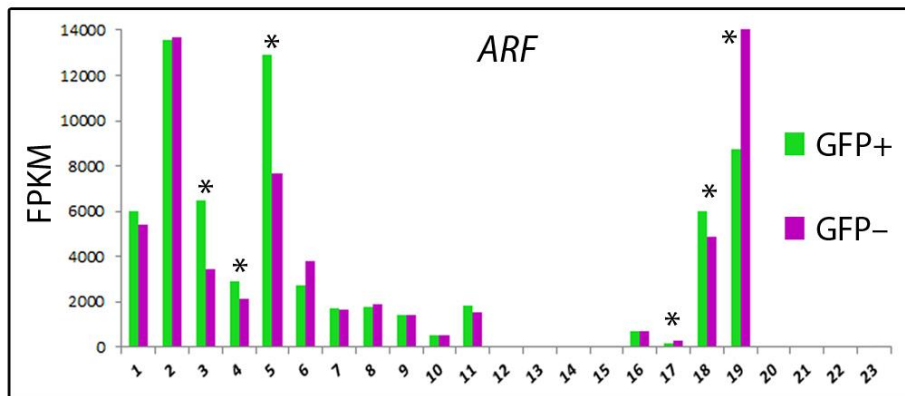


**Abbildung 12: Transkriptmengen von Auxinbiosynthese-Genen**

Die Transkriptmengen sind als FPKM in GFP+ (grün) sowie GFP- Zellen (pink) von zwölf Genen, die am Auxinbiosyntheseweg über Indol-3-pyruvat beteiligt sind, dargestellt. Signifikant ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ) unterschiedliche Transkriptlevel zwischen den beiden Zelltypen sind mit einem Sternchen gekennzeichnet.



Die 23 *ARF*-Gene weisen häufig nicht signifikant unterschiedliche Transkriptmengen zwischen GFP+ und GFP– Zellen auf (Abbildung 13), acht Gene werden in keinem der Zelltypen exprimiert (*ARF12-15, 20-23*). Im Gegensatz dazu werden sechs Gene signifikant ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ) unterschiedlich exprimiert, von denen vier Gene eine höhere Expression in GFP+ Zellen (*ARF3, 4, 5, 18*) bzw. zwei Gene eine stärkere Genaktivität in GFP– Zellen (*ARF17, 19*) aufweisen.



**Abbildung 13: Transkriptmengen der 23 *ARF* (*AUXIN RESPONSE FACTOR*)-Gene**

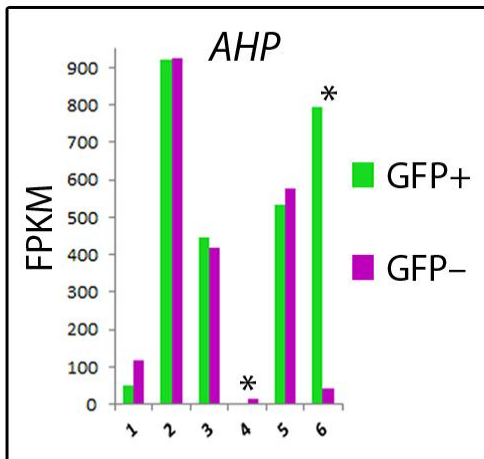
Die Genexpression der 23 *ARF*-Genen ist als FPKM der GFP+ (grün) und GFP– (pink) Zellen dargestellt. Ein signifikanter ( $p\text{-Wert} \leq 0,01$ ) Unterschied in den Transkriptmengen der beiden Zelltypen ist mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Wenige der untersuchten mit Auxin assoziierten Gene werden im Vergleich der GFP+ und GFP– Zellen differenziell transkribiert. Besteht eine differenzielle Regulation liegt häufig eine Herunterregulation vor, besonders ist dies bei den *Aux/IAA* sowie *PIN* Genen zu beobachten (Anhang A 7.3, Abbildung 31). Ausnahmen wie z. B. *MP* und *ETTIN* (*ETT, ARF3, AT2G33860*) werden in den GFP+ Zellen hochreguliert.

### 3.2.8 Veränderungen in der Expression von Genen des Cytokininsignalweges

Da Cytokinin ähnlich wie Auxin in der Entwicklung einer Pflanze involviert ist, werden ebenfalls die Transkriptmengen von Genen, die am Cytokininsignalweg beteiligt sind, näher betrachtet. Die Transkriptlevel der einzelnen sechs *AHP*-Gene von *A. thaliana* sind unterschiedlich hoch (Abbildung 14), die Genexpression ist jedoch nur in *AHP4* und 6 zwischen GFP+ und GFP– Zellen verändert. *AHP4* weist geringe Transkriptzahlen auf und ist in GFP– Zellen stärker exprimiert. Im Gegensatz wird *AHP6* in GFP+ Zellen stark hochreguliert ( $FC = 18,08$ ).

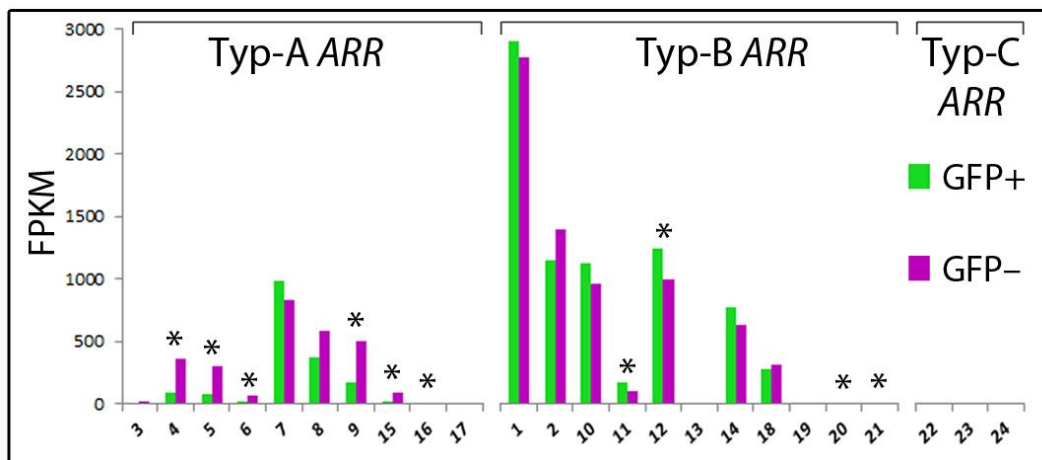




**Abbildung 14: Transkriptlevel von HISTIDINE-CONTAINING PHOSPHOTRANSMITTER (AHP)**

Die Transkriptanzahl ist als FPKM der sechs AHPs in GFP+ (grün) und GFP- (pink) Zellen dargestellt. Ein signifikanter (p-Wert  $\leq 0,01$ ) Unterschied in den Transkriptmengen der beiden Zelltypen ist mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Die drei Typ-C ARR<sub>s</sub> werden weder in GFP+ noch in GFP- Zellen exprimiert (Abbildung 15). Im Gegensatz dazu können von den meisten Typ-A und Typ-B ARR<sub>s</sub> Transkripte in GFP+ oder GFP- Zellen nachgewiesen werden. Generell weisen Typ-B ARR<sub>s</sub> höhere Transkriptlevel als Typ-A ARR<sub>s</sub> auf, aber Typ-A ARR<sub>s</sub> werden öfter signifikant unterschiedlich transkribiert bzw. herunterreguliert. Im Vergleich dazu werden zwei der Typ-B ARR<sub>s</sub> (ARR11, 12) hochreguliert.



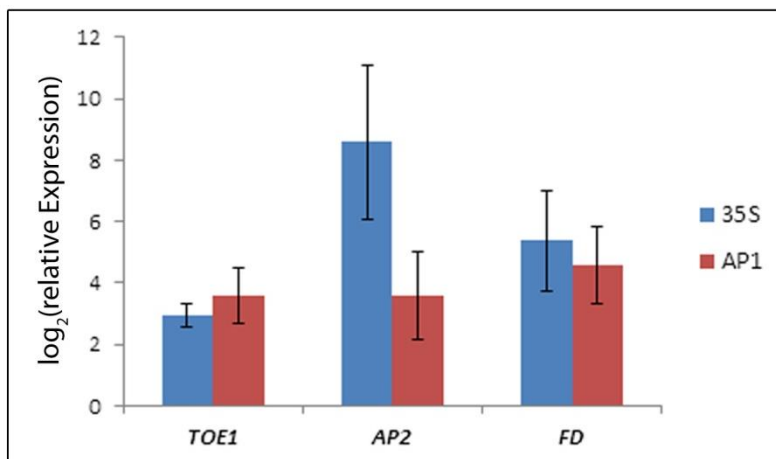
**Abbildung 15: Transkriptmengen der RESPONSE REGULATOR (ARR)**

Die Transkriptmengen der Typ-A, Typ-B und Typ-C ARR<sub>s</sub> sind als FPKM im Vergleich von GFP+ (grün) und GFP- Zellen (pink) dargestellt. Ein signifikanter (p-Wert  $\leq 0,01$ ) Unterschied in den Transkriptmengen der beiden Zelltypen ist mit einem Sternchen gekennzeichnet.

Ein Teil der hier gezeigten Gene des Cytokininsignalweges werden differenziell reguliert, meistens konnte eine Herunterregulation nachgewiesen werden. Eine der Ausnahmen stellt AHP6, welches in den GFP+ Zellen hochreguliert wird.

### 3.3 Identifikation von DRNL Zielgenen

Zur Identifizierung von möglichen Zielgenen des Transkriptionsfaktors DRNL wurde die Methode der Chromatin-Immunopräzipitation mit nachfolgender Hochdurchsatzsequenzierung (ChIP-Seq) angewendet. Für eine Etablierung der Methode wurde angestrebt die Ergebnisse von Kaufmann et al. (2010b) zu replizieren. Nach einem induzierten Kernimport des AP1-GR Fusionsproteins, exprimiert unter dem nativen bzw. dem Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor, wurden Infloreszenzen von *ap1cal A. thaliana* Pflanzen geerntet. Eine Überprüfung von drei Genomregionen zeigt eine spezifische Anreicherung der DNA-Sequenzen nach Dexamethason-Applikation im Vergleich zu unbehandelten Infloreszenzen (Abbildung 16). Die veröffentlichten Ergebnisse konnten für beide Promotoren für die untersuchten DNA-Sequenzen bzw. mit der adaptierten Methode bestätigt werden.



**Abbildung 16: qPCR von ChIP-Proben des *ap1cal* Infloreszenzmeristems von Pflanzen mit dem Transgen *AP1/35S::AP1-GR*** Proben einer ChIP von *ap1cal* Infloreszenzmeristemen mit und ohne Dexamethason-Applikation, deren Zellen das Fusionsprotein AP1-GR unter dem nativen AP1-Promotor bzw. dem Cauliflower Mosaic Virus 35S Promotor exprimieren, wurden mittels qPCR auf eine Anreicherung an DNA-Fragmenten in den mit Dexamethason behandelten Infloreszenzen in Bezug auf die Gene *TARGET OF EARLY ACTIVATION TAGGED 1* (TOE1, AT2G28550), *APETALA 2* (AP2, AT4G36920) und *FD* (AT4G35900) anhand ihrer logarithmierten relativen Expression überprüft.

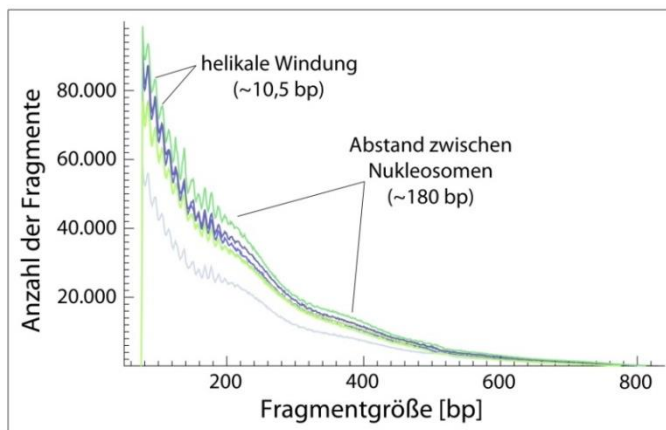
Die Versuchsdurchführung wurde auf *DRNL::DRNL-GR ap1cal* bzw. *bcm1* Infloreszenzmeristemen zur Identifikation von DRNL Zielgenen übertragen, im Durchschnitt konnten ungefähr 440.000 in *ap1cal* bzw. 214.000 in *bcm1* deduplizierte Fragmente isoliert werden. Eine signifikante Anreicherung von spezifisch gebundenen DNA-Sequenzen konnte auch nach Veränderungen im Versuchsablauf, wie zum Beispiel Verlängerung der Zeit zwischen Dexamethason Applikation und Ernte der Infloreszenzen sowie Einsatz des zusätzlichen „Cross-linkers“ EGS, nicht erreicht und daher keine direkten Zielgene von DRNL identifiziert werden.

### 3.4 Identifizierung von zugänglichen Chromatinregionen

Mittels ATAC-Seq wurden die signifikant zugänglichen Chromatinregionen (THS) in den Zellen mit aktivem bzw. inaktivem *DRNL*-Promotor des *ap1cal A. thaliana* IM identifiziert. Eine THS kann zwischen GFP+ (grün) und GFP– Zellen (blau) unterschiedlich hoch sein (differentielle THS, dTHS), daher kann zwischen Genen mit einer höheren dTHS in GFP+ Zellen (dTHS+) bzw. in GFP– Zellen (dTHS–) unterschieden werden.

#### 3.4.1 Größenverteilung der sequenzierten Fragmente

Aus den Zellkernen von 95.000 bis 300.000 Protoplasten pro Probe ergeben sich 118 bis 142 Millionen sequenzierte Fragmente. Nach Deduplikation sowie Entfernen des Anteils von Mitochondrien- bzw. Chloroplasten-DNA (~40%) verbleiben im Durchschnitt 25 Millionen Fragmente, die dem *A. thaliana* Genom (TAIR10) zugeordnet werden können. Die sequenzierten Chromatinfragmente besitzen eine Größe von circa 100 – 800 bp (Abbildung 17). Wie schon in Buenrostro et al. (2013) beschrieben, lässt die Frequenz der auftretenden Fragmentgrößen die helikale Windung von circa 10,5 bp erkennen. Ein gehäuftes Vorkommen an Fragmenten derselben Größe bei ungefähr 200 bzw. 380 bp könnte die Position von Nukleosomen markieren, deren Abstand in Buenrostro et al. (2013) mit 200 bp angegeben wurde.



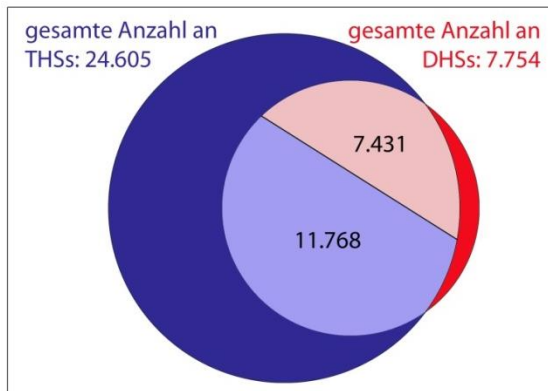
**Abbildung 17: Verteilung der ATAC-Seq Fragmente anhand ihrer Größe**

Die Anzahl der Fragmente wird nach ihrer Länge in bp aufgetragen. Die spezifische Verteilung in den drei biologischen Replikaten lässt die helikale Windung mit 10,5 bp als auch die Position von benachbarten Nukleosomen mit einem Abstand von etwa 180 bp in GFP+ (grün) und auch GFP– (blau) Zellen erkennen.

#### 3.4.2 Effizienz der ATAC-Seq Methode gegenüber DNase-Seq

Genomweit konnten 24.605 Regionen mit THS in *ap1cal A. thaliana* IMs identifiziert werden (Abbildung 18), circa dreimal mehr als die von Pajoro et al. (2014) veröffentlichten DHSs

(7.754). 95% (7.431) der DHSs wurden ebenfalls mit der ATAC-Seq Methode identifiziert. Zusätzlich konnte mittels ATAC-Seq die Differenzierung von DHSs in mehrere THSs erreicht werden, die 7.431 DNase I zugänglichen Stellen entsprechen daher 11.768 THSs. Zusätzlich wurden spezifisch mittels ATAC-Seq 12.837 Regionen mit offenem Chromatin identifiziert. Daher zeigt die ATAC-Seq Methode gegenüber DNase-Seq eine höhere Sensitivität bzw. Effizienz in der Identifikation von Chromatinstrukturen.

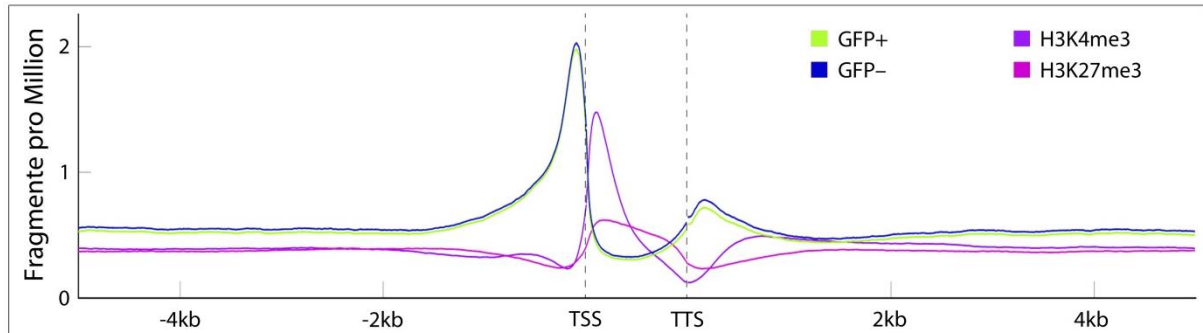


**Abbildung 18: Effizienz der ATAC-Seq gegenüber DNase-Seq in der Identifizierung von zugänglichem Chromatin**  
 Von der Gesamtanzahl der mittels ATAC-Seq identifizierten THS (24.605; dunkelblau) können knapp die Hälfte auch nach DNase I Behandlung ermittelt werden (11.768; hellblau). Mittels DNase-Seq wurden insgesamt 7.754 DHSs ermittelt (rot), von denen 7.431 mit THSs korrelieren (hellrot).

### 3.4.3 Position von THSs in Relation zum Gen

Zur Identifikation der Position von THSs in Relation zu einem Gen werden THSs, die in dem zu transkribierenden Bereich eines Gens sowie den umgebenden Regionen in einem Abstand von 5 kb liegen, jeweils diesem Gen zugeordnet (Abbildung 19). Es ist möglich, dass nach dieser Definition ein Gen sowohl eine THS in GFP+ als auch in GFP– Zellen aufweist. Von den 33.602 Genen (TAIR10), die bisher in *A. thaliana* identifiziert werden konnten, zeigen 25.995 in GFP+ Zellen bzw. 26.171 in GFP– Zellen eine signifikant erhöhte Zugänglichkeit gegenüber der Tn5 Transposase (Anhang B 8.2). Fast alle der nuklearen Gene, die in *A. thaliana* transkribiert werden (TAIR10: 28.496), weisen demnach eine THS auf. Das Auftreten von THSs in Relation zum Transkriptionsstart (TSS) oder der Transkriptionsterminationsstelle (TTS) unterscheidet sich kaum zwischen den beiden Zelltypen; die höchste Anreicherung an Fragmenten kann in einem Bereich direkt vor dem TSS sowie in schwächerer Form nach dem TTS festgestellt werden, jeweils in einem Abstand bis ungefähr 1 kb. Der zu transkribierende Bereich weist im Gegensatz dazu die niedrigste Zugänglichkeit auf.

Im Vergleich zu epigenetischen Chromatinmodifikationen in *ap1cal* IMs mit dreifach methyliertem Lysin 4 bzw. 27 des Histons 3 zum Zeitpunkt t0 (Engelhorn et al., 2017), die eine Aktivierung bzw. Hemmung der Genexpression bewirken, fällt eine komplementäre Verteilung auf. Die Anzahl der mittels ChIP-Seq ermittelten Fragmente ist für beide Histonmodifikationen kurz nach dem TSS am höchsten und weist kurz vor dem TSS und am TTS die niedrigste Anreicherung auf.



**Abbildung 19: Genomweite Verteilung von THSs und Histonmodifikationen in Relation zu Transkriptionsstart (TSS) und Transkriptionsterminationsstelle (TTS) eines Gens**

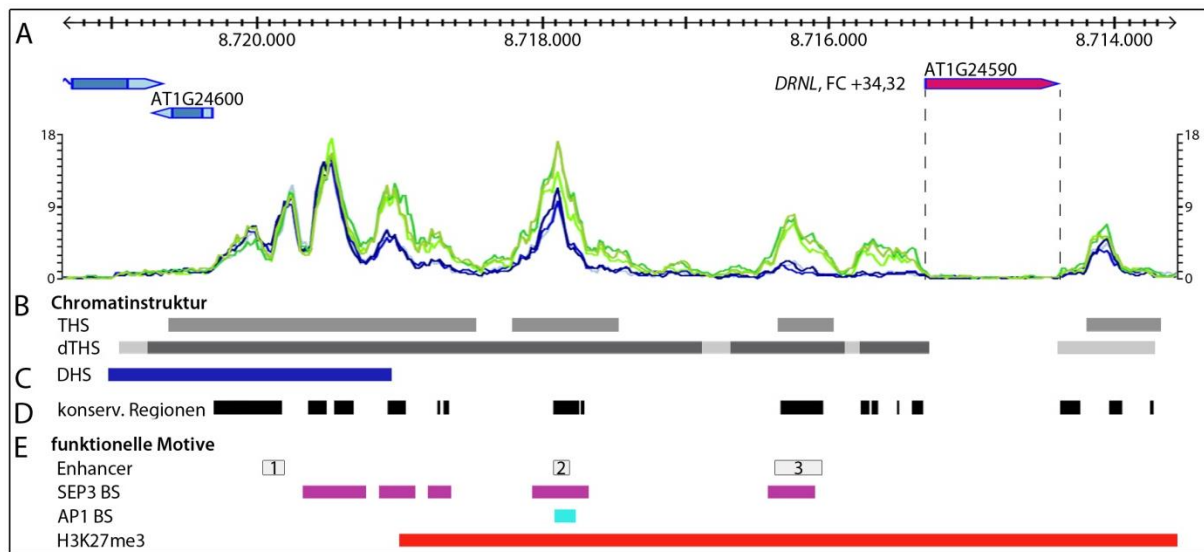
Die Verteilung der ATAC-Seq Fragmente pro eine Million Fragmente ist über einen Bereich von -5 kb bis 5 kb in Bezug auf den Transkriptionsstart (TSS) bzw. der Transkriptionsterminationsstelle (TTS) in GFP+ (grün) und GFP- Zellen (blau) der drei biologischen Replikate im Vergleich zu Dreifachmethylierungen am Lysin K4 bzw. K27 des Histons 3 (H3K4me3 (violett) bzw. H3K27me3 (orange)) aufgetragen. Zur besseren Vergleichbarkeit wurde der Bereich zwischen TSS und TTS als 1 kb festgelegt und der tatsächlich zu transkribierende Bereich eines Gens relativ dazu aufgetragen.

Die Mehrheit der THSs ist in Relation zum Gen direkt vor dem TSS lokalisiert.

### 3.4.4 THSs im *DRNL*-Promotor und ihre Korrelation mit bekannten Motiven

Die DNA-Sequenz ab dem Startcodon von *DRNL* bis zum TSS des Gens AT1G24600 wird als *DRNL*-Promotor definiert und zeigt eine hohe Kongruenz in der Verteilung von ATAC-Seq Fragmenten in drei biologischen Replikaten von GFP+ sowie GFP- Zellen (Abbildung 20A). Daher ist die Tatsache, dass der *DRNL* Promotor aufgrund des Transgens zweimal vorhanden ist, vernachlässigbar; die Position der THSs verändert sich nicht, nur die Anzahl der betrachteten DNA-Fragmente ist erhöht. Der *DRNL*-Promotor enthält drei THSs (Abbildung 20B), von denen eine sich mit einer DHS (Pajoro et al., 2014) überschneidet (Abbildung 20C) sowie mittels ATAC-Seq in vier diskrete Peaks unterteilt werden kann. Eine signifikant unterschiedliche Verteilung an Fragmenten kann im Vergleich von GFP+ zu GFP- Zellen über den gesamten Promotorbereich in zwei bzw. drei der drei biologischen Replikate festgestellt werden (Abbildung 20B). Besonders deutlich ist dieser Unterschied in der Region bis 0,5 kb vor dem

offenen Leseraster von *DRNL* zu sehen, in der eine dTHS+ lokalisiert ist bzw. die in den GFP– Zellen unzugänglich ist.



**Abbildung 20: Position von THSs im *DRNL* Promotor und ihre Korrelation mit bekannten Motiven**

Im *DRNL* Promotor (A) konnten THSs (B) sowie dTHSs (B) in 2 (hellgrau) bzw. 3 (dunkelgrau) der 3 biologischen Replikate in GFP+ (grün) und GFP– (blau) Zellen identifiziert werden. Die Position von THSs korreliert mit DNase I hypersensitiven Stellen (DHS; C), konservierten Regionen nach „Phylogenetic Shadowing“ (D) sowie den funktionellen Elementen (E) Enhancer, SEPALLATA3 Bindestellen (violett), APETALA1 Bindestellen (türkis) und einer H3K27me3 Histonmodifikation (rot). Der OLR von *DRNL* ist in dunkelrot markiert. Der positive FC beschreibt den Faktor, mit dem die Transkriptmenge in GFP– Zellen multipliziert werden muss um das Transkriptlevel von GFP+ Zellen zu erreichen.

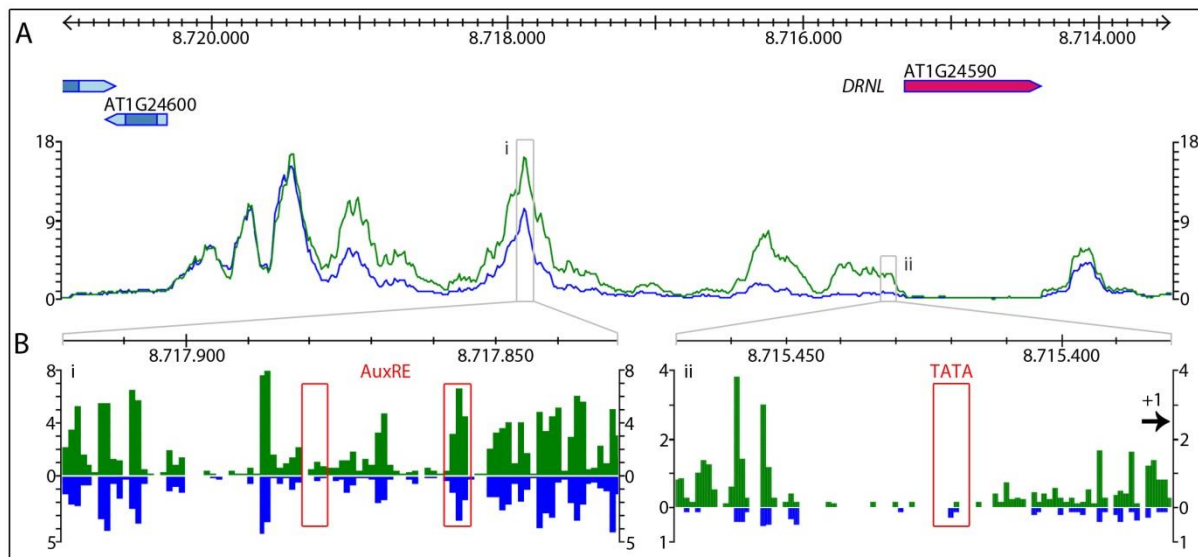
THSs bzw. einzelne Peaks überschneiden sich häufig mit Bereichen (Abbildung 20D), deren DNA-Sequenz laut „Phylogenetic Shadowing“ konserviert ist. Eine Anreicherung an Fragmenten konnte auch an Positionen von bereits identifizierten, funktionellen Motiven (Abbildung 20E) nachgewiesen werden, wie am Beispiel der drei Enhancer (En) von *DRNL* (Comelli et al., 2016) zu sehen. Des Weiteren können Bindestellen der MADS-box Transkriptionsfaktoren SEP3 und AP1 (Pajoro et al., 2014) im *DRNL*-Promotor mit ATAC-Seq Peaks korreliert werden. Die *DRNL*-Expression wird aufgrund der dreifachen Methylierung des Lysins 27 von Histon 3 im *ap1cal* IM gehemmt (Engelhorn et al., 2017).

Der Promotor von *DRNL* weist mehrere THS bzw. dTHS auf, die teilweise in mehrere Peaks unterteilt werden können, die DNA-Sequenz ist an diesen Positionen häufig konserviert sowie überschneidet sich mit funktionellen Motiven.

### 3.4.5 Zugänglichkeit des Chromatins im Enhancer 2 und am Transkriptionsstart von *DRNL*

Zum genaueren Betrachten der Schnittpunkte der Tn5 Transposase werden exemplarisch jeweils 90 bp des En2 (i) bzw. am TSS (ii) aus Abbildung 21A vergrößert in Abbildung 21B dargestellt.

Die Position von Schnittstellen am En2 ist in beiden Zelltypen ähnlich (Abbildung 21B i), die Chromatinzugänglichkeit ist in GFP+ Zellen jedoch höher als in GFP– Zellen. Die zwei putativen AuxREs im En2 weisen unterschiedliche Chromatinstrukturen auf, das distale AuxRE ist unzugänglich bzw. das proximale AuxRE ist offen. Das Chromatin am Transkriptionsstart (+1) von *DRNL* ist zugänglich in GFP+ bzw. geschlossen in GFP– Zellen (Abbildung 21B ii). Im Gegensatz ist die TATA-Box, die sich 30 bp vor dem TSS befindet (Comelli et al., 2016), in beiden Zelltypen unzugänglich.



**Abbildung 21: Schnittstellen der Tn5 Transposase im Enhancer 2 und am Transkriptionsstart von *DRNL***

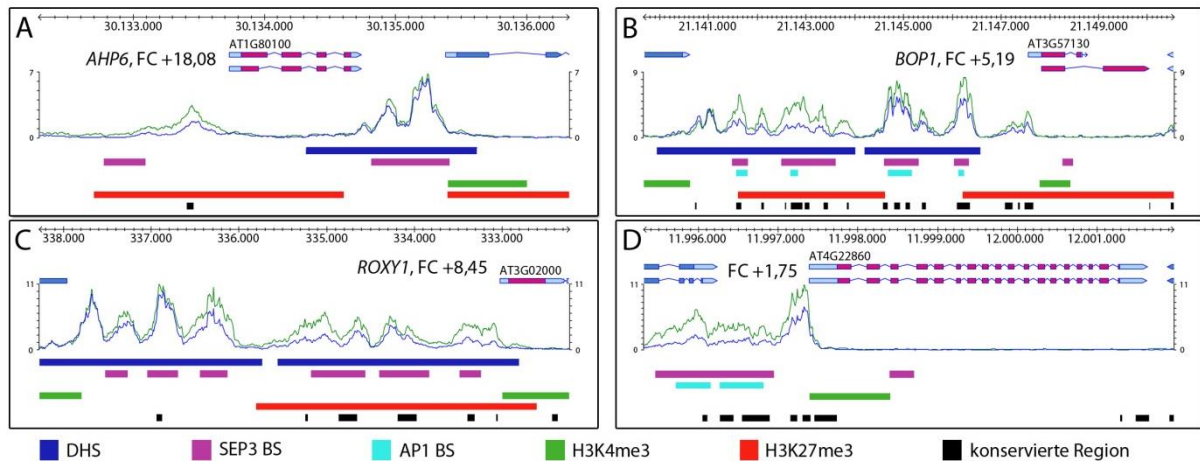
Die Verteilung der ATAC-Seq Fragmente im *DRNL* Promotor ist als Mittelwert der drei biologischen Replikate dargestellt (A). Eine Vergrößerung des Enhancers 2 (B i) sowie des Transkriptionsstarts (B ii), markiert mit +1, zeigt die Schnittpunkte der Tn5 Transposase. Rote Kästen markieren mögliche Auxin responsive Elemente (AuxRE) bzw. eine TATA-Box.

### 3.4.6 Bestätigung der im *DRNL*-Promotor identifizierten Korrelation von THSs mit bekannten Motiven

Im *DRNL*-Promotor korreliert die Position von THSs bzw. einzelnen Peaks mit bekannten Motiven, daher wurde dieser Zusammenhang bei weiteren Genen überprüft. Die hier im Detail untersuchten acht Gene können in vier Kategorien eingeteilt werden: 1. Beteiligung an der Blütenentwicklung oder Hochregulation der Genexpression in GFP+ Zellen, 2. Zellzykluskontrolle, 3. Haushaltsgene sowie 4. höhere Genexpression in GFP– gegenüber GFP+ Zellen.



Die Promotorregionen von *AHP6*, *BOP1* und *ROXY1* (AT3G02000) sowie des im Zellzyklus involvierten Gens *AT4G22860* (Abbildung 22) weisen alle THS bzw. dTHS+ auf, die zum Teil in mehrere Peaks differenziert werden können. Auffällig ist, dass bei allen vier Genen direkt vor dem Transkriptionsstart ein Peak identifiziert werden kann, ebenso wie im *DRNL*-Promotor bzw. in der allgemeinen Verteilung von THSs genomweit (Abbildung 19) zu sehen, und dieser eine erhöhte Zahl an ATAC-Seq Fragmenten in GFP+ gegenüber GFP- Zellen aufweist.



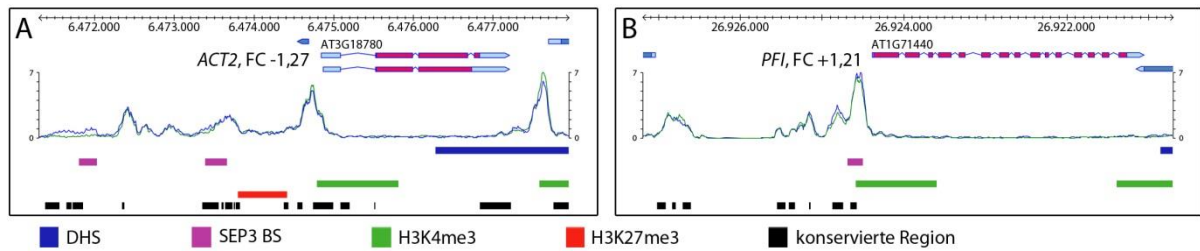
**Abbildung 22: THSs und ihre Korrelation mit bekannten Motiven von drei Genen der Blütenentwicklung sowie einem Gen der Zellzykluskontrolle**

Die Anzahl der ermittelten Fragmente pro eine Million Fragmente wird als Mittelwert aus drei biologischen Replikaten in den Genen *HISTIDINE PHOSPHOTRANSFER PROTEIN 6* (A), *BLADE ON PETIOLE 1* (B), *ROXY1* (C) und *AT4G22860* (D) gezeigt. Die Position von THSs bzw. einzelne Peaks kann mit DNase I hypersensitiven Stellen (DHS), SEPALLATA3 (SEP3) Bindestellen (BS), APETALA1 (AP1) BS, Dreifachmethylierungen des Lysins 4 (H3K4me3) bzw. Lysins 27 (H3K27me3) am Histon 3 sowie konservierten Regionen resultierend aus Phylogenetic Shadowing korreliert werden. Der FC beschreibt den Wert aus RNA-Seq, mit dem die Transkriptmenge in GFP- Zellen multipliziert werden muss, um das Transkriptlevel in GFP+ Zellen zu erreichen.

Die meisten THSs korrespondieren mit DHSs sowie mit Bindestellen der MADS-box Transkriptionsfaktoren SEP3 bzw. AP1, außerdem korrelieren einzelne Peaks einer THS häufig mit konservierten Regionen. Eine niedrigere Genexpression von *AHP6*, *BOP1* und *ROXY1* in den GFP- gegenüber GFP+ Zellen spiegelt sich in H3K27me3 Histonmodifikationen wider. Im Gegensatz dazu konnte in *AT4G22860* eine H3K4me3 Markierung identifiziert werden; dies korreliert mit hohen Transkriptmengen in beiden Zelltypen, deren Zahl in GFP+ Zellen leicht höher ist als in den GFP- Zellen.

Die Genexpression der zwei Haushaltsgene *ACT2* (Abbildung 23A) und *PFIFFERLING* (*PFI*, AT1G71440; Abbildung 23B) verändert sich nicht signifikant zwischen den zwei Zelltypen. Beide Gene weisen THSs, aber keine dTHS oder DHSs, in ihrem Promotor auf, einzelne Peaks korrelieren jedoch mit SEP3 Bindestellen sowie konservierten Regionen.

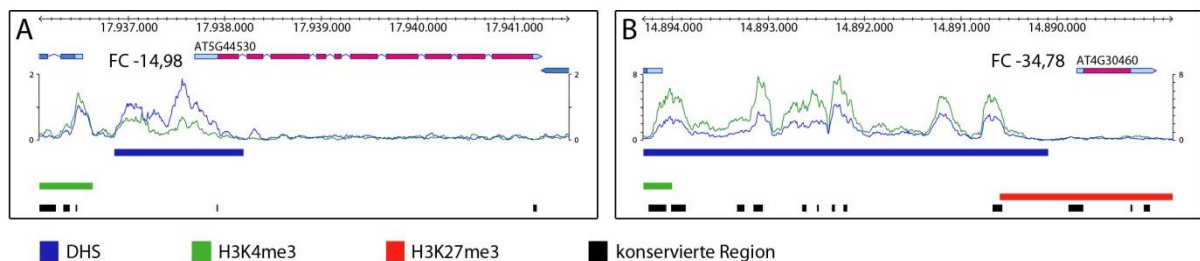




**Abbildung 23: THSs und ihre Korrelation mit bekannten Motiven von zwei Haushaltsgenen**

Die Anzahl der ermittelten Fragmente pro eine Million Fragmente wird als Mittelwert aus drei biologischen Replikaten in den Genen *ACTIN2* (A) sowie *PFIFFERLING* (B) gezeigt. Die Position von THSs wird mit DNase I hypersensitiven Stellen (DHS), SEPALLATA3 (SEP3) Bindestellen (BS), APETALA1 (AP1) BS, Dreifachmethylierungen des Lysins 4 (H3K4me3) am Histon 3 sowie konservierten Regionen resultierend aus Phylogenetic Shadowing verglichen. Der FC beschreibt den Wert aus RNA-Seq, mit dem die Transkriptmenge in GFP– Zellen multipliziert werden muss, um das Transkriptlevel in GFP+ Zellen zu erreichen. Bei einem negativen FC erfolgt die reziproke Rechnung, da hier die Genexpression höher in GFP– als in GFP+ Zellen ist.

Zwei Beispiele für herunterregulierte Gene mit THSs sind AT5G44530 (Abbildung 24A), ein Enzym der Subtilase-Familie, bzw. AT4G30460 (Abbildung 24B), ein glycinreiches Protein. Eine erhöhte Zugänglichkeit in diesen Chromatinregionen wurde ebenfalls mittels DNase-Seq nachgewiesen, ATAC-Seq bietet im Vergleich jedoch eine höhere Auflösung bzw. identifiziert mehrere Peaks. Auffällig ist bei diesen beiden Genen die Verteilung der Fragmente im Vergleich der beiden Zelltypen, im Promotor von AT5G44530 konnte eine dTHS– bzw. von AT4G30460 eine dTHS+ identifiziert werden. Ein weiterer Unterschied sind die Histonmodifikationen, die bei AT5G44530 nicht nachzuweisen sind, AT4G30460 ist im Gegensatz dazu mit einer H3K27me3 Markierung, ähnlich wie *DRNL*, assoziiert.



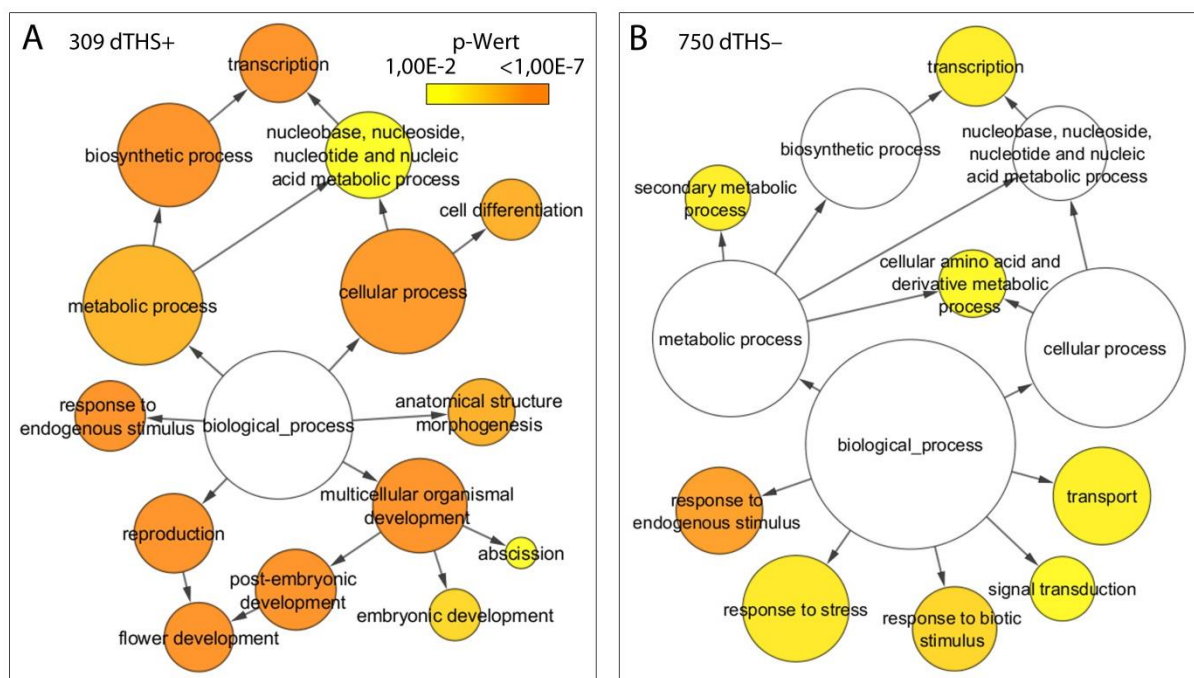
**Abbildung 24: THSs und ihre Korrelation mit bekannten Motiven von zwei Genen mit höherer Genexpression in GFP– als in GFP+ Zellen**

Die Anzahl der ermittelten Fragmente pro eine Million Fragmente wird als Mittelwert aus drei biologischen Replikaten in den Genen AT5G44530 (A) sowie AT4G30460 (B) gezeigt. Die Position von THSs wird mit DNase I hypersensitiven Stellen (DHS), SEPALLATA3 (SEP3) Bindestellen (BS), APETALA1 (AP1) BS, Dreifachmethylierungen des Lysins 4 (H3K4me3) am Histon 3 sowie konservierten Regionen resultierend aus Phylogenetic Shadowing verglichen. Der negative FC beschreibt den Wert aus RNA-Seq, mit dem die Transkriptmenge in GFP+ Zellen multipliziert werden muss, um das Transkriptlevel in GFP– Zellen zu erreichen.

Die bereits im *DRNL*-Promotor beobachtete Differenzierung von THSs in mehrere Peaks sowie ihre Korrelation mit DHSs, Transkriptionsfaktorbindestellen und konservierten Regionen, konnte für weitere acht Gene bestätigt werden. Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit zwischen GFP+ und GFP– Zellen spiegelt sich meistens in der Genexpression wider.

### 3.4.7 Einordnung der mit THSs korrelierten Gene in funktionelle GO-Gruppen

Um eine funktionelle Analyse der Gene mit dTHS zu ermöglichen, werden zuerst die Gene mit einer dTHS in einer maximalen Entfernung von 1 kb identifiziert sowie anschließend GO-Gruppen zugeordnet (Abbildung 19). Die Region bis 1kb stromauf- bzw. –abwärts enthält am häufigsten THSs, zusätzlich wird die Wahrscheinlichkeit einer falschen Zuordnung minimiert, die bei der Auswahl eines größeren Bereichs aufgrund von geringen Abständen zwischen benachbarten Genen auftreten kann. 309 Gene sind mit einer dTHS+ assoziiert (Abbildung 25A), demgegenüber stehen 750 Gene mit einer dTHS– (Abbildung 25B). Zwei Gene kommen in beiden Kategorien vor, d.h. sie weisen sowohl eine dTHS+ als auch dTHS– auf. Die Signifikanz der GO-Gruppen von dTHS+ Genen ist höher als die der Gene mit dTHS–. Abgesehen von übergeordneten Kategorien sind die GO-Gruppen Transkription sowie „response to endogenous stimulus“ in beiden Netzwerken vertreten.



**Abbildung 25: Funktionelle Einordnung von Genen mit dTHS in GO-Gruppen**

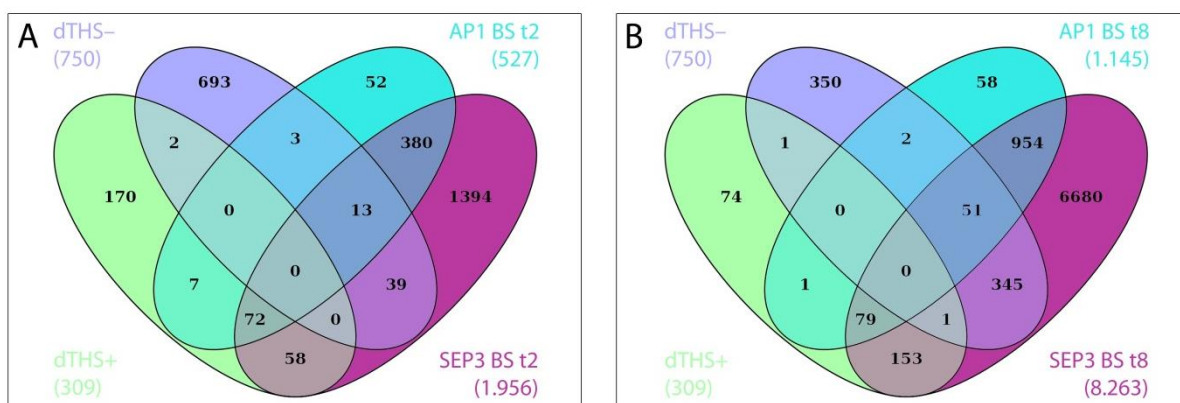
Gene mit einem höheren dTHS in GFP+ Zellen (dTHS+) bzw. in GFP– Zellen (dTHS–) werden GO-Gruppen mittels des Programms BiNGO zugeordnet. Eine signifikante Anreicherung ist entsprechend farblich markiert.

Die GO-Gruppen des dTHS– Netzwerks sind zu einem großen Teil mit der Antwort auf einen Reiz bzw. Stress assoziiert. Im Gegensatz sind die dTHS+ Gene geprägt durch die GO-Gruppen Zelldifferenzierung und Blütenentwicklung.

### 3.4.8 Genomweite Korrelation von THSs mit AP1 bzw. SEP3 Bindestellen

*DRNL* sowie die Beispieltene aus Abschnitt 3.4.6 zeigen eine häufige Übereinstimmung in der Position von THSs bzw. einzelnen Peaks mit Bindestellen der Transkriptionsfaktoren AP1 und SEP3. Auch genomweit kann diese positive Korrelation bestätigt werden (Anhang A 7.4, Abbildung 32 A-D), ein Gen mit AP1 bzw. SEP3 Bindestelle (Pajoro et al., 2014) weist zu mindestens 99,95% auch eine THS in einem Bereich bis zu 5 kb stromauf- und -abwärts auf. Bei der Betrachtung eines 1 kb Bereichs, in dem die meisten THSs identifiziert wurden, verringert sich die Zahl auf circa 95%. Da fast alle der AP1 bzw. SEP3 Bindestellen in offenen Chromatinregionen zu finden waren, soll nachfolgend überprüft werden, ob AP1 bzw. SEP3 die Bindung von dTHS+ oder dTHS– präferieren (Anhang B).

Von den insgesamt 309 Genen mit dTHS+ korrelieren nach zwei Tagen Dexamethason-Applikation (t2) circa 44% mit AP1 und/oder SEP3 Bindestellen (Abbildung 26A), diese Anzahl steigt nach acht Tagen (t8) auf 75% an (Abbildung 26B); dies beruht hauptsächlich auf einer Zunahme der SEP3 Bindestellen. Nach zwei Tagen Induktion weisen die 750 Gene mit dTHS– wenige AP1 und/oder SEP3 Bindestellen auf, im Vergleich zu t8 wird die Anzahl an dTHS– Genen mit AP1 bzw. SEP3 Bindestellen von 7% auf 53% erhöht. Dies beruht hauptsächlich auf einem Anstieg der Bindestellen, die nur von SEP3 und nicht von AP1 gebunden werden; hier ist ein fast neunfacher Anstieg von t2 zu t8 zu vermerken.



**Abbildung 26: Venn-Diagramm von Genen mit dTHS sowie AP1 und/oder SEP3 Bindestelle**

Die dargestellten Venn-Diagramme zeigen die Korrelation von dTHS+ bzw. dTHS– Genen mit AP1 und SEP3 Bindestellen (BS) aus ChIP-Seq Experimenten nach zwei (A) bzw. 8 (B) Tagen kontinuierlicher Dexamethason-Applikation in *AP1::AP1-GR ap1cal* IMs.

Es kann eine positive Korrelation zwischen Transkriptionsfaktorbindestellen und THS bzw. dTHS festgestellt werden. AP1 Bindestellen befinden sich eher in den dTHS+ Genen und werden vielfach schon bei t2 gebunden. SEP3 Bindestellen binden bei t2 eher dTHS+ Gene, zum



mit den herunterregulierten Genen. Eine Ausnahme bildet ein Gen, das eine dTHS<sup>−</sup> aufweist, aber hochreguliert wird.

Eine genauere Betrachtung der hoch- und herunterregulierten Gene in einer „Heatmap“ (Anhang A 7.5 Abbildung 34) zeigt, dass sich die genomweit ermittelte Position von THS in Relation zu einem Gen hier widerspiegelt und eine erhöhte Zugänglichkeit häufig in der Region vor dem Transkriptionsstart und selten im transkribierten Bereich zu finden ist. Die 717 hochregulierten Gene sind hauptsächlich mit einer höheren Chromatinzugänglichkeit in GFP<sup>+</sup> gegenüber GFP<sup>−</sup> Zellen korreliert. Im Gegensatz dazu sind die 3.356 herunterregulierten Gene eher mit einer niedrigeren Zugänglichkeit in GFP<sup>+</sup> im Vergleich zu GFP<sup>−</sup> Zellen assoziiert. Nach einer FC-abhängigen Sortierung der Gene scheinen die hochregulierten Gene mit einem hohen FC bzw. die herunterregulierten Gene mit einem niedrigen FC zugänglicher zu sein.

Es kann festgestellt werden, dass generell die Genexpression und Chromatinzugänglichkeit miteinander korrelieren. Hochregulierte Gene weisen eher eine dTHS<sup>+</sup> auf, während für herunterregulierte Gene häufiger eine dTHS<sup>−</sup> identifiziert werden kann.

## 4 Diskussion

### 4.1 Das Transkriptom von Gründer- sowie Infloreszenzmeristemzellen

Die Analyse von Gründerzellen lateraler Seitenorgane im IM von *ap1cal* Pflanzen soll Zusammenhänge in Bezug auf die Spezifizierung von Zellen aufklären. Die Trennung der durch die *DRNL::erGFP* Expression markierten Gründerzellen vom restlichen IM konnte mittels FACS effizient durchgeführt werden. Eine Hauptkomponentenanalyse bestätigt das Transkriptom der Gründerzellen (GFP+) als distinkt unterschiedlich zu den restlichen IM-Zellen (GFP-) sowie gegenüber dem gesamten, nicht-protoplastierten IM.

#### 4.1.1 Veränderungen in der Genexpression aufgrund von Stress

Um die Auswirkungen von Stress in Form des Protoplastierens sowie Sortierens auf die Genexpression zu überprüfen, wurde das Transkriptom der protoplastierten GFP+ bzw. GFP- Zellen mit dem von unbehandelten IMs verglichen. Von vielen der nuklearen Gene von *A. thaliana* können Transkripte im IM nachgewiesen werden, von denen über 20.000 auch in GFP+ und GFP- Zellen zu finden sind. Ein Unterschied zwischen den einzelnen Transkriptomen ist die höhere Anzahl an exprimierten Genen in den GFP+ sowie GFP- Zellen als im IM. Eine funktionelle Zuordnung mittels BiNGO konnte nicht bestätigen, dass diese zusätzlichen Gene mit der Reaktion auf Stress assoziiert sind. Daher wurden die Gene, die in den GFP+ bzw. GFP- Zellen im Vergleich zum IM differenziell regulierten werden, ermittelt sowie GO-Gruppen zugeordnet. Die GFP+ und GFP- Zellen zeigen eine hohe Übereinstimmung an gegenüber dem IM hoch- bzw. herunterregulierten Genen. Dazu gehören Stressgene, die nach dem Protoplastieren sowie FACS häufig hoch- aber teilweise auch herunterreguliert werden, möglicherweise aufgrund von Genen die an der Stressantwort beteiligt sind, aber denen auch noch andere Aufgaben zugeschrieben werden. Gene der Blütenentwicklung sowie Zelldifferenzierung werden im Gegensatz nach Stress herunterreguliert. Diese Beobachtungen konnten für einzelne Gene in der qPCR bestätigt werden; *DRNL*, *AHP6* und *BP* werden nach Stress herunterreguliert, das Hitzeschock Protein *HSP70* (Lindquist, 1986) ist jedoch hochreguliert. Die Zellen des IMs reagieren demnach auf Stress mit einer Verän-

derung der Genexpression, wodurch sich zelluläre Prozesse verändern bzw. der Impuls Blüten zu bilden reduziert wird.

Neben den vielen Genen die gegenüber dem IM sowohl in GFP+ als auch GFP– Zellen entweder hoch- oder herunterreguliert werden, gibt es auch Gene, die entweder spezifisch in GFP+ oder GFP– Zellen differenziell transkribiert werden. Spezifisch in den Gründerzellen werden im Gegensatz zu den GFP– Zellen auch nach Stress immer noch Blütenentwicklungsgene, jedoch keine Stressgene, spezifisch hochreguliert. Die Hochregulation der Blütenentwicklungsgene könnte damit begründet werden, dass die Gründerzellen nur eine Minderheit im IM darstellen, Unterschiede in der Genexpression zwischen GFP+ Zellen und IM werden daher stärker wahrgenommen als im Vergleich der GFP– Zellen mit dem IM, da die GFP– Zellen die Mehrheit der IM-Zellen repräsentieren. Dennoch kann festgestellt werden, dass auch nach Stress in den GFP+ aber nicht in den GFP– Zellen Gene der Blütenentwicklung transkribiert werden. Es wäre auch möglich, dass die Stressreaktion in GFP– Zellen schneller bzw. stärker erfolgt als in GFP+ Zellen, deren Genexpression bereits mit Ziel auf die Differenzierung der spezifizierten Zellen reguliert wurde und sie weniger flexibel auf Stress reagieren können. Dafür spricht auch, dass keins der spezifisch in GFP+ Zellen hochregulierten Gene der GO-Gruppe Transkription zugeordnet werden kann. Dies zeigt, dass obwohl GFP+ und GFP– Zellen große Gemeinsamkeiten in ihrem Transkriptom aufweisen, die vermutlich darauf beruhen, dass sie aus dem gleichen Gewebe stammen und auf Stress reagieren mussten, es doch auch zelltypspezifische Unterschiede in Bezug auf Stressantwort und Blütenentwicklung gibt.

#### **4.1.2 Das Transkriptom der Gründerzellen im direkten Vergleich zu den GFP– Zellen**

Die im direkten Vergleich von GFP+ und GFP– Zellen differenziell transkribierten Genen sind überwiegend herunterreguliert (3.356) und nur ein kleiner Teil wird hochreguliert (717). Drei GO-Gruppen sind sowohl bei den hoch- als auch den herunterregulierten Genen vertreten, diese beschreiben allgemein wichtige Prozesse in der Zelle, wie z. B. die Beteiligung an der Transkription. Davon abgesehen sind die GO-Netzwerke unterschiedlich, die herunterregulierten Gene sind unter anderem mit der Stressantwort und dem Zelltod involviert, die hochregulierten Gene hingegen mit der Blütenentwicklung. Die schon im Vergleich zum IM beobachteten Unterschiede im Transkriptom der protoplastierten Zellen können in der

direkten Gegenüberstellung von den in GFP+ zu GFP– Zellen hoch- bzw. herunterregulierte Gene bestätigt werden, die Gründerzellen sind mit der Blütenentwicklung und die GFP– Zellen mit der Stressantwort assoziiert.

Das nach *DRNL* in den Gründerzellen am stärksten hochregulierte Gen ist *AHP6* (FC = 18,08), ein Zielgen von *DRNL*, auch zwei weitere der insgesamt fünf Zielgene (*STY1*, *CUC1*) werden hochreguliert. Dies spricht dafür, dass *DRNL* als Aktivator der Transkription agiert. Des Weiteren werden Gene, die in Blättern die adaxiale-abaxiale Polarität beeinflussen, in den Gründerzellen differenziell reguliert. Dazu gehören z. B. *LFY*, *YAB1*, *BOP1* sowie *BOP2*, die hochreguliert und der GO-Gruppe Blütenentwicklung zugeordnet werden. Weitere Gene, die adaxiale bzw. abaxiale Zellen in einem Organ definieren, wie z. B. *PHB*, *PHV*, *REV* oder drei der vier *KAN*-Gene (Emery et al., 2003; Wu et al., 2008; Fukushima und Hasebe, 2014) werden gemeinsam in den Gründerzellen exprimiert. *BP* wird in den Gründerzellen reprimiert und reguliert die Expression von *BOP 1* und *BOP2*, wodurch die adaxiale-abaxiale Polarität beeinflusst wird. Die Beteiligung von *DRNL* an der Regulation des Zellzyklus (Seeliger et al., 2016) spiegelt sich in der entsprechenden GO-Gruppe der hochregulierten Gene wider, damit übereinstimmend wird *CYCLIN B1;1* (AT4G37490) (Schnittger und De Veylder, 2018) in den Gründerzellen stärker exprimiert als in den GFP– Zellen.

Die differenziell exprimierten Gene erfahren eine zelltypspezifische Regulation ihrer Genexpression in den Gründerzellen im Vergleich zu den GFP– Zellen, die jeweiligen Zellen werden durch ihre biologischen Prozesse bzw. GO-Gruppen charakterisiert. Die Gründerzellen unterscheiden sich deutlich von den GFP– Zellen und sind mehr in der Blütenentwicklung jedoch weniger in der Stressantwort involviert als die restlichen IM-Zellen.

#### **4.1.3 Phytohormonperzeption in den Gründerzellen**

Die äußerliche Applikation von Auxin auf das SAM bzw. IM bewirkt die Bildung von Blättern bzw. Blüten (Reinhardt et al., 2003; Capua und Eshed, 2017), daher ist Auxin notwendig für die Bildung von lateralen Seitenorganen im IM, aber ist nicht der alleinige Faktor in diesem Prozess (Chandler, 2011). Das Auxinsignal detektiert mittels des DR5-Reporters (Ulmasov et al., 1997) ist ähnlich wie *DRNL* in Zellen am Rand des IMs lokalisiert, beide Expressionsdomänen überschneiden sich jedoch nur marginal (Chandler und Werr, 2014). Es stellt sich daher die Frage, ob *DRNL* und Auxin miteinander interagieren oder unabhängig sind. Der für die



Detektion des Auxinsignals verwendete DR5-Reporter bildet nur einen Teil der Auxinantwort ab (Liu et al., 1994) und kann auch auf Brassinosteroide reagieren (Bao et al., 2004). Daher könnte ein Vergleich mit dem Auxin Sensor DII-VENUS (Brunoud et al., 2012) weitere Informationen über die zeitliche sowie räumliche Aktivität von Auxin im IM bzw. den Gründerzellen im Verhältnis zum *DRNL*-Promotor liefern. Der *DRNL*-Promotor enthält putative AuxREs, es wäre daher möglich, dass die *DRNL*-Expression von Auxin reguliert wird. Dafür spricht auch, dass MP im Embryo an das zu *DRNL* paraloge Gen *DRN* bindet (Cole et al., 2009).

Die Expression von Genen des IAA Biosyntheseweges durch YUC-Proteine sowie der *ARF*-, *Aux/IAA*- und *PIN*-Gene des Auxinsignalweges variiert stark zwischen einzelnen Genen. Kann eine differenzielle Transkription beobachtet werden, ist meistens der FPKM in GFP– Zellen höher als in den Gründerzellen. Davon ausgenommen sind vier *ARF* Gene, die eine höhere Expression in GFP+ Zellen aufweisen, darunter sind *ETT* (*ARF3*) und *MP* (*ARF5*). Beide Transkriptionsfaktoren konnten in entstehenden Blütenprimordien nachgewiesen werden und sind notwendig für die wildtypische Ausprägung von Blüten (Sessions et al., 1997; Bhatia et al., 2016). Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Perzeption bzw. die Reaktion auf ein Auxinsignal in den Gründerzellen nur über wenige Gene erfolgt.

Das Phytohormon Cytokinin ist ähnlich wie Auxin auch an der Entwicklung von Blüten beteiligt (Ferreira und Kieber, 2005; Müller und Sheen, 2007; D'Aloia et al., 2011), ist aber anders als Auxin eher im Zentrum des IMs lokalisiert (Besnard et al., 2014). Die *AHP*-Gene sind Teil des Cytokininisignalweges und werden meist ähnlich stark in den GFP+ und GFP– Zellen exprimiert. Auffällig ist das *DRNL* Zielgen *AHP6*, welches in den Gründerzellen stark transkribiert und auch gegenüber den GFP– Zellen mit dem insgesamt zweithöchsten FC (18,08) der hochregulierten Gene differenziell reguliert wird. Dies lässt vermuten, dass *DRNL* aktivierend auf die Transkription von *AHP6* in den Gründerzellen wirkt. Da sich die Expressionsdomänen von *DRNL* und *AHP6* überschneiden (Besnard et al., 2014; Thoma und Chandler, 2015) und *AHP6* den Cytokininisignalweg inhibiert, scheint Cytokinin nicht bzw. kaum biologische Prozesse in den Gründerzellen zu regulieren bzw. wird Cytokinin nicht unmittelbar für die Spezifizierung bzw. Differenzierung der Zellen benötigt.

Auch in den GFP– Zellen scheint der Cytokininisignalweg gehemmt zu werden, da viele der Typ-A *ARRs*, die Typ-B *ARRs* auf noch nicht geklärte Weise inhibitorisch regulieren (Ren et al.,

2009; Pekárová et al., 2016), stärker in den GFP– als in den GFP+ Zellen exprimiert werden. Die stärkere Transkription der Typ-A *ARRs* in den GFP– Zellen könnte jedoch auch damit erklärt werden, dass Typ-A *ARRs* mit dem genregulatorischem Netzwerk von *WUS* und *CLV3* interagieren und so die Stammzellpopulation, die Teil der GFP– Zellen ist, regulieren (Leibfried et al., 2005; Zhao et al., 2010).

Die Gründerzellen von lateralen Seitenorganen im IM von *A. thaliana* zeigen wenig Regulation in ihrer Genexpression durch Auxin oder Cytokinin, da Gene, die mit einem der beiden Phytohormone assoziiert sind sowie differenziell transkribiert werden, meistens höhere Transkriptzahlen in GFP– als in GFP+ Zellen aufweisen. Mögliche Regulation durch die Phytohormone könnte sich in einer posttranskriptionalen Modifikation manifestieren. Eine weitere Möglichkeit für eine Regulation durch Auxin bzw. Cytokinin in den Gründerzellen könnte mittels veränderter Expression von einzelnen Genen wie z. B. von *MP*, *ETT* sowie *AHP6*, die in den Gründerzellen hochreguliert werden, hervorgerufen werden. Die direkte Verbindung des Auxinsignalweges mit *AHP6* durch die potenzielle Bindung von MP (Besnard et al., 2014) sowie die Hemmung des Cytokininsignalweges durch *AHP6* in den GFP+ Zellen lässt vermuten, dass die Genexpression in den Gründerzellen eher als Antwort auf Auxin als auf Cytokinin reguliert wird.

## 4.2 Identifikation der DRNL Zielgene

Direkte Zielgene von DRNL sollten mittels der adaptierten ChIP-Methode von Kaufmann et al. (2010a), mit der erfolgreich Bindestellen des Transkriptionsfaktors AP1 in *ap1cal* Infloreszenzen bestätigt werden konnten, identifiziert werden. Es konnten jedoch weder im *ap1cal* IM, in dem mehr Zellen *DRNL* exprimieren als im Wildtyp, noch in *bcm1* IMs, in denen die Konkurrenzsituation in der DNA-Bindung des nativen sowie transgenen DRNL vermieden wird, spezifisch gebundene DNA-Fragmente angereichert werden. Da nicht bekannt ist, ob DRNL direkt an die DNA bindet oder über andere Transkriptionsfaktoren rekrutiert wird, wurde zusätzlich der „Crosslinker“ EGS, mit dem Protein-DNA-Vernetzungen über größere Entfernungen im Vergleich zu Formaldehyd erreicht werden können, verwendet. Da auch dies nicht zur Identifikation von DRNL-Zielgenen führte, ist die *DRNL*-Expression im IM vermutlich zu gering um spezifisch DNA anzureichern, dafür sprechen auch die niedrigen Zahlen an isolierten DNA-Fragmenten. Im Vergleich zu *AP1* ist die Transkriptionsrate von

*DRNL* im *ap1cal* IM geringer, *AP1* weist in den GFP+ Zellen einen FPKM von 1.702 bzw. in GFP– Zellen von 1.062 auf, *DRNL* hingegen 200 bzw. 5. Die Expressionsdomäne von *AP1* ist daher größer als die von *DRNL* und auch die Transkriptionsstärke von *AP1* ist höher. In einem weiteren Versuch könnte die Menge an *DRNL*-GR durch Expression unter dem Cauliflower Mosaic Virus 35S (CaMV 35S) Promotor (Odell et al., 1988; Benfey und Chua, 1990) bzw. eines anderen Promotors, der in vielen Zellen starke Aktivität aufweist, erhöht werden, um so das Sensitivitätsproblem zu vermeiden. Dies birgt jedoch den Nachteil der ektopischen *DRNL*-Expression; das Bindeverhalten von *DRNL* könnte in den Zellen ohne aktiven, nativen *DRNL*-Promotor z. B. aufgrund von unterschiedlicher Chromatinstruktur oder Proteomen gegenüber den Gründerzellen verändert sein.

### **4.3 Veränderungen der Chromatinzugänglichkeit in den Gründerzellen**

Die hier vorgestellten Chromatinstrukturen von *ap1cal* Infloreszenzmeristemen aus ATAC-Seq zeigen eine hohe Reproduzierbarkeit zwischen mehreren biologischen Replikaten. Aufgrund der ermittelten Chromatinkonfiguration können Rückschlüsse auf die biologische Relevanz von Genomregionen gezogen werden. Insbesondere die Trennung von *DRNL*-exprimierenden (GFP+) von den nicht-exprimierenden (GFP–) Zellen ermöglicht die Identifikation von Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit von Gründerzellen im Vergleich zu den umgebenden, übrigen Infloreszenzmeristemzellen.

#### **4.3.1 Hohe Sensitivität in der Erkennung von Chromatinstrukturen**

Die Tn5 Transposase integriert Adaptoren sowohl in die DNA des Zellkerns als auch in die von Mitochondrien und Chloroplasten; der Anteil an identifizierten, nicht nuklearen DNA-Sequenzen nach Deduplikation ohne vorheriges Isolieren der Nuklei beträgt ungefähr 40%. Der Anteil an Organellen-DNA in den untersuchten Proben des *ap1cal* IM ist damit im Vergleich zu publizierten ATAC-Seq Ergebnissen gering; Proben ohne Isolation von Zellkernen mittels INTACT von sieben bis acht Tage alten Pflanzen (Lu et al., 2016) bzw. von Stamm- und Mesophyllzellen Sijacic et al. (2018) von *A. thaliana* enthielten 52% bis 79% DNA-Fragmente, die nicht auf dem nuklearen Genom verankert werden konnten. Diese Unterschiede in der Menge an nuklearer bzw. Organellen-DNA sind möglicherweise auf die gewebespezifische Anzahl an Chloroplasten in den jeweiligen Zellen zurückzuführen (Charuvi et al., 2012;

Dolzblasz et al., 2016). Die Verteilung der sequenzierten DNA-Fragmente mit ähnlicher Länge lässt sowohl die helikale Windung der DNA von circa 10,5 bp (Buenrostro et al., 2013), korrespondierend mit der zugänglichen, außenliegenden, kleinen Furche im Nukleosom (Zhong et al., 2018), als auch den Abstand von benachbarten Nukleosomen erkennen, der bei *A. thaliana* Blüten in etwa 180 bp beträgt (Zhang et al., 2015).

Für eine erste Einschätzung der Bedeutung von Tn5 Transposase hypersensitiven Stellen (THSs) wurde ihre Position mit der von DNase I hypersensitiven Stellen (DHSs) verglichen; 95% der von Pajoro et al. (2014) im *ap1cal* IM identifizierten DHSs überschneiden sich mit THSs. Die wenigen DHSs, die mit ATAC-Seq nicht erkannt wurden, sind möglicherweise auf die unterschiedlichen Transgene oder den gesetzten Schwellenwert für signifikante THSs zurückzuführen. Generell zeigte die ATAC-Seq Methode eine deutlich höhere Sensitivität in der Erkennung von Chromatinstrukturen als die DNase-Seq; es konnten insgesamt circa dreimal mehr THSs als DHSs identifiziert werden. Knapp die Hälfte der ermittelten THSs korrelieren mit DHSs, daher konnten viele zugängliche Chromatinregionen nur mittels ATAC-Seq identifiziert werden. Außerdem ermöglicht ATAC-Seq die Unterteilung von THSs in Bereiche, in denen das Chromatin, obwohl es generell zugänglich ist, doch feine Unterschiede in dem Grad der Zugänglichkeit aufweisen kann. Dies wird in Form von einzelnen Peaks innerhalb einer THS sichtbar und kann zum Beispiel im *DRNL*-Promotor beobachtet werden. Aus diesen Gründen bietet die Verwendung der ATAC-Seq Methode neben der geringeren Menge an benötigten Zellen (Buenrostro et al., 2013) den Vorteil aufgrund der höheren Sensitivität gegenüber der DNase-Seq Chromatinstrukturen detaillierter darzustellen.

#### **4.3.2 Position der THSs in Relation zu einem Gen**

Von den 28.496 nuklearen Genen (TAIR10), die in *A. thaliana* transkribiert werden, zeigen über 91% eine signifikant erhöhte Zugänglichkeit gegenüber der Tn5 Transposase in einem Bereich von 5 kb stromaufwärts des TSS bzw. stromabwärts des TTS sowie im offenen Leseraster (OLR). Auch in einem kleineren betrachteten Bereich von 1 kb weisen noch über 72% der Gene eine THS auf. Ein Großteil der Gene ist daher zugänglich, obwohl mit dem IM ein spezifisches Gewebe zu einem bestimmten Zeitpunkt, der aktiven *DRNL*-Expression, analysiert wurde. Die häufig offene Chromatinstruktur von Genen ermöglicht schnelle Verände-

rungen in der Regulation der Transkription durch Bindung von Aktivatoren bzw. Repressoren zu bewirken, wie es vermutlich bei der Ausdifferenzierung der Gründerzellen von Vorteil ist.

Die Position der THSs in Relation zu einem Gen unterscheidet sich, genomweit betrachtet, kaum zwischen GFP+ und GFP- Zellen. Unterschiede ergeben sich aus einzelnen Genen, deren THS Position von der genomweiten Verteilung abweicht bzw. die dTHSs aufweisen, wie zum Beispiel in *AHP6* sowie *DRNL* am TSS. Am häufigsten traten THSs direkt vor dem TSS bis in eine Entfernung von 1 kb und selten im kodierenden Bereich auf. Diese Verteilung könnte spezifisch für Pflanzen sein, da ähnliche Ergebnisse für die Wurzel (Maher et al., 2017), Stammzellen des SAM sowie Mesophyllzellen (Sijacic et al., 2018) ermittelt wurden, in menschlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen des Pankreas zugängliche Regionen jedoch häufiger in Introns als im Promotor zu finden waren (Ackermann et al., 2016). Es könnte ein Zusammenhang zum größeren Genom sowie zur durchschnittlichen Genlänge von *Homo sapiens* (Piovesan et al., 2016) im Vergleich zu *A. thaliana* (Derelle et al., 2006) bestehen. Die Position von THSs relativ zum Gen korreliert in den GFP+ und GFP- Zellen mit einer komplementären Verteilung von Histonmarkierungen am Lysin 4 bzw. 27 des Histons 3, die eine Aktivierung bzw. Hemmung der Genexpression vermitteln. Am TSS konnten wenige Histonmodifikationen identifiziert werden; dies beruht vermutlich auf der Abwesenheit von Nukleosomen in dieser Region (Zhong et al., 2018). Dennoch konnten auch an dieser Position signifikante Veränderungen in der Chromatinkonfiguration ermittelt werden. Wie am Beispiel von *DRNL* beobachtet werden kann, ist diese Region in den Gründerzellen zugänglich aber in den GFP- Zellen geschlossen. Das offene Chromatin am TSS bietet die Möglichkeit für die Bindung von Transkriptionsfaktoren, z.B. eines TATA-binding Proteins (TBP), das den Präinitiationskomplex rekrutiert und so die Transkription ermöglicht (Murakami et al., 2015; Thomas und Chiang, 2006).

#### **4.3.3 Chromatinzugänglichkeit von *DRNL***

Im *DRNL*-Promotor konnten drei THSs identifiziert werden, von denen eine in mehrere Peaks unterteilt wird, zusätzlich konnte in den Gründerzellen im Gegensatz zu den GFP- Zellen zugängliches Chromatin am TSS nachgewiesen werden. Generell ist die DNA-Sequenz im Zentrum eines Peaks im *DRNL*-Promotor häufig konserviert, ihre funktionelle Bedeutung wird durch die positionelle Korrelation mit Bindestellen der Transkriptionsfaktoren AP1 und

SEP3 (Pajoro et al., 2014) sowie drei Enhancern (Comelli et al., 2016) verifiziert. Diese Beobachtungen konnten für weitere exemplarisch ausgewählte Gene bestätigt werden.

Aufgrund der Isolation der Gründerzellen mittels FACS können Unterschiede in der Chromatinzugänglichkeit von GFP+ und GFP- Zellen (dTHS) ermittelt werden. Der *DRNL*-Promotor weist mehrere Bereiche mit dTHS auf, besonders auffällig ist dies am TSS sowie dem Enhancer 3 (En3); diese Chromatinregion weist in den *DRNL*-exprimierenden Zellen eine offene Konfiguration auf, ist im Gegensatz jedoch in den GFP- Zellen kaum zugänglich. Dies spiegelt sich in der Genexpression von *DRNL* wider; wenige GFP-Transkripten bzw. *DRNL*-Transkripte wurden in den GFP- Zellen nachgewiesen, im Vergleich dazu ist das *DRNL*-Transkriptlevel um den FC = 34,32 in den Gründerzellen erhöht. Das zugänglichere Chromatin in den Gründerzellen korreliert demnach mit einer gesteigerten Genexpression. Genomweit weist diese Region kurz vor dem TSS am häufigsten THSs auf, wie auch im *AHP6*-Promotor zu sehen, und spricht damit für die große Bedeutung in der Veränderung der Chromatinzugänglichkeit an dieser Position. Aufgrund der Bindung von einzelnen Transkriptionsfaktoren, eines Enhanceosoms (Panne, 2008; Carey, 1998) bzw. des Präinitiationskomplexes (Thomas und Chiang, 2006; Murakami et al., 2015) in offenem Chromatin kann die Genaktivität reguliert bzw. die Transkription gestartet werden.

Eine genauere Betrachtung der Tn5 Transposase Schnittpunkte am TSS von *DRNL* zeigt eine fast gänzlich geschlossen vorliegende TATA-Box in den GFP+ sowie GFP- Zellen. Im Gegensatz dazu ist der TSS zugänglich, jedoch nur in den Gründerzellen. Dies könnte mit der Bindung der TATA-Box von einem aktivierenden Transkriptionsfaktor in den GFP+ Zellen bzw. von einem Repressor (Brower et al., 2010) in den GFP- Zellen erklärt werden, die daraufhin eine zelltypspezifische Regulation der Genexpression bewirken. Eine weitere Ursache für das geschlossene Chromatin der TATA-Box bzw. offene am TSS könnte die Sequenzspezifität der Tn5 Transposase sein; das Enzym schneidet bevorzugt in einer eher GC- als AT-reichen DNA-Sequenz (Madrigal, 2015). Da die TATA-Box jedoch in einer AT-reichen Regionen liegt und die umgebenden Regionen mit einem höheren GC-Gehalt in den GFP+ Zellen hoch signifikant zugänglich sind, ist dieser Bias zu vernachlässigen.

Der Enhancer 2 (En2) des *DRNL*-Promotors liegt innerhalb einer THS und weist sowohl in GFP+ als auch GFP- Zellen offene Chromatinstrukturen auf, die Zugänglichkeit ist jedoch in

den Gründerzellen höher. Der En2 enthält zwei putative AuxREs, die wichtig für die wild-typische Expression von *DRNL* sind (Comelli et al., 2016). Das zum TSS proximale AuxRE scheint eine größere bzw. das distale eine untergeordnete Bedeutung für die Blütenentwicklung aufzuweisen (unveröffentlichte Daten) und stimmt daher mit der erhöhten Chromatinzugänglichkeit des proximalen bzw. dem geschlossenen Zustand des distalen AuxRE überein.

Mittels ATAC-Seq können daher Veränderungen in der Chromatinstruktur mit einer hohen Auflösung erkannt werden, auch wenn nur von wenigen Basenpaaren die Zugänglichkeit verändert ist, sodass die Identifikation von für die Regulation der Genexpression wichtigen Chromatinregionen ermöglicht wird.

#### **4.3.4 Funktionelle Unterschiede der Gene mit dTHS+ oder dTHS–**

Die Gene mit dTHS+ bzw. dTHS– können unterschiedlichen funktionellen Kategorien zugeordnet werden; von den überrepräsentierten GO-Gruppen ist nur eine (Transkription) in beiden GO-Netzwerken vertreten. Die GO-Gruppen der dTHS+ Gene sind unter anderem mit der Blütenentwicklung sowie Zelldifferenzierung assoziiert. Im Gegensatz dazu sind die Gene mit dTHS– weniger durch biologische Prozesse, die im Zusammenhang mit einem Gewebe oder Entwicklungszustand stehen, sondern z. B. durch Transport oder Stressantwort charakterisiert. Diese funktionelle Zuordnung erinnern sehr an die der differenziell regulierten Gene; viele GO-Gruppen überschneiden sich zwischen den hochregulierten sowie dTHS+ Genen bzw. den herunterregulierten sowie dTHS– Genen. Von den Genen mit dTHS– sind mehr mit der Stressantwort assoziiert als von den dTHS+ Genen (195 zu 48). Dies zeigt, dass in den GFP– Zellen nicht nur Stressgene stärker hochreguliert werden als in den Gründerzellen, sondern auch ihr Chromatin in den GFP– Zellen eine höhere Zugänglichkeit aufweist. Eine Veränderung in der Expression von Stressgenen kann so in den GFP– Zellen leichter erfolgen als in den Gründerzellen.

#### **4.3.5 Korrelation von THS sowie dTHS mit Transkriptionsfaktorbindestellen**

Da sowohl im Promotor von *DRNL* als auch für weitere acht Gene häufig eine positionelle Übereinstimmung von AP1 und SEP3 Bindestellen (Pajoro et al., 2014) mit THS bzw. einzelnen Peaks in einer THS beobachtet werden konnte, wurde ebenfalls ihre genomweite Korrelation analysiert. Die Bindestellen von einzelnen Transkriptionsfaktoren bestehen aus einer

kurzen Nukleotidfolge (Teif und Rippe, 2011; Franco-Zorrilla et al., 2014; Isakova et al., 2017), daher werden Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit durch Bindung von Transkriptionsfaktoren nur bei Betrachtung von kleinen Chromatinregionen bzw. Schnittstellen der Tn5 Transposase erwartet, wie am Beispiel des proximalen AuxRE im En2 des *DRNL*-Promotors zu sehen ist.

Die AP1 bzw. SEP3 Bindestellen sind zu mindestens 94% innerhalb oder in der Nähe einer THS lokalisiert. Daher zeigt die ATAC-Seq Methode eine höhere Sensitivität in der Erkennung von offenem Chromatin im Vergleich zu DNase-Seq, mit der maximal eine Übereinstimmung von 75% von DHS mit Transkriptionsfaktorbindestellen erzeugt werden konnte (Pajoro et al., 2014). Obwohl AP1 früher aktiv ist als SEP3, ist die Überschneidung an Genen mit Bindestelle sowie THS vergleichbar. Dies bedeutet, dass auch wenn ein Transkriptionsfaktor erst zu einem späteren Zeitpunkt bindet, das Chromatin an der Bindestelle schon zu einem früheren Zeitpunkt zugänglich ist.

Im Gegensatz zu den Genen mit THS zeigen die Gene mit dTHS ein geringeres Ausmaß an Überschneidungen mit AP1 oder SEP3 Bindestellen. Da der OLR sowie 1 kb stromauf- sowie -abwärts betrachtet wird, finden einige dTHS, die mit AP1 bzw. SEP3 Bindestellen überlappen, keine Beachtung, wie am Beispiel von *DRNL* und *BOP1* zu sehen ist. Dennoch kann eine deutliche Korrelation zwischen Genen mit dTHS und AP1 bzw. SEP3 Bindestellen beobachtet werden. Gene mit dTHS+ weisen häufig eine AP1 Bindestelle auf, die Anzahl an Genen verändert sich im Vergleich von zwei (t2) und acht Tagen (t8) Dex-Applikation (Pajoro et al., 2014) nur geringfügig, ebenso werden 58 der Gene zu beiden Zeitpunkten gebunden. Im Gegensatz zu AP1 verändert sich die Verteilung der SEP3 Bindestellen zwischen den beiden Zeitpunkten. An t2 sind mehr SEP3-Zielgene unter den dTHS+ Genen zu finden; nach acht Tagen nimmt die Zahl der Gene mit SEP3 Bindestelle sowie dTHS stark zu, woraufhin die SEP3 Zielgene hauptsächlich mit dTHS– Genen korrelieren. Dies zeigt, dass SEP3 Zielgene generell später gebunden werden als die AP1 Zielgene, korrespondierend zu ihrer Funktion bei der Blütenentwicklung. Die Transkriptionsfaktorbindestellen können also, anders als in Pajoro et al. (2014) beschrieben, schon zu einem relativ frühen Zeitpunkt zugänglich sein, ähnlich wie in einem Vergleich von Stamm- und Mesophyllzellen beschrieben (Sijacic et al., 2018).



Werden putative Zielgene von DRNL (Eklund et al., 2011; Ikeda et al., 2006) betrachtet, sind vier dieser fünf Gene, u.a. *AHP6* und *STY1*, in den Gründerzellen hochreguliert. Zusätzlich weist jedes dieser Gene in seinem Promotor eine THS auf, die für *AHP6* und *STY1* auch eine dTHS+ ist. Als mögliche Bindestelle von DRNL wurde die GCC-Box ermittelt, die in vier der fünf Gene innerhalb der THS identifiziert werden konnte. Dies unterstützt die Theorie, dass es sich bei dieser Nukleotidfolge um die DRNL-Bindestelle handelt, bzw. unterstreicht die hohe Bedeutung dieser zugänglichen Chromatinregion für die Regulation und Expression der putativen Zielgene von DRNL. Die ATAC-Seq Methode könnte also, besonders im Zusammenhang mit phylogenetischen Analysen, eingesetzt werden, um mögliche Transkriptionsfaktorbinstellen in Pflanzen zu identifizieren.

#### **4.4 Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit korrelieren mit differenziell regulierter Genexpression**

Viele Gene, von denen in *A. thaliana* Transkripte nachgewiesen werden konnten, zeigen eine erhöhte Chromatinzugänglichkeit gegenüber der Tn5 Transposase in IM-Zellen (> 72%). Daher stellt sich die Frage, ob diese Chromatinregionen für die Kontrolle der Genexpression essenziell sind und ob sie eine unmittelbare Bedeutung für das hier untersuchte Gewebe haben oder zum Teil erst in späteren Stadien, wie in Sijacic et al. (2018) beschrieben, ihre Relevanz zeigen. Die Analyse von in Gründerzellen exprimierten bzw. nicht-exprimierten Genen zeigt, dass aktive Gene häufiger (>90%) eine THS aufweisen als inaktive Gene (<45%). Auch fast alle der im Vergleich von GFP+ und GFP- Zellen differenziell regulierten Gene weisen eine THS auf, diese Korrelation ist jedoch bei den hochregulierten Genen stärker ausgeprägt. Dies spricht für die erfolgreiche Identifikation von für die Genexpression regulatorisch wichtigen Chromatinregionen, die bereits im IM relevant für Veränderungen in der Genexpression sind. Da Gene mit THSs eher exprimiert sowie hochreguliert als nicht-exprimiert sowie herunterreguliert werden, könnte dies bedeuten, dass offenes Chromatin in den hier untersuchten Zellen eher von aktivierenden Transkriptionsfaktoren gebunden wird als von reprimierenden.

Es weisen mehr Gene eine dTHS- als eine dTHS+ auf, da auch mehr Gene herunter- als hochreguliert werden, könnte hier ein Zusammenhang bestehen. In der Tat korrelieren die Gene mit dTHS+, wie z. B. *AHP6*, eher mit den hochregulierten Genen bzw. dTHS- Gene mit den

herunterregulierten Genen. Eine Zunahme der Genexpression wird also von einer Öffnung des Chromatins begleitet bzw. geht dieser voraus. Zu einem entsprechenden Ergebnis gelangten Ackermann et al. (2016) bei der Analyse von mittels FACS getrennten menschlichen  $\alpha$ - und  $\beta$ -Zellen des Pankreas für die  $\alpha$ -Zellen. In dieser Publikation (Ackermann et al., 2016) konnte ebenfalls beobachtet werden, dass nicht alle der Gene mit dTHS auch differenziell transkribiert werden, die publizierten Werte sind jedoch niedriger als die im Rahmen dieser Doktorarbeit ermittelten Zahlen. Dennoch zeigen die Gene mit dTHS eine hohe Übereinstimmung in ihrer biologischen Funktion, identifiziert mittels BiNGO, mit denen der hoch- bzw. herunterregulierten Gene. Dies lässt vermuten, dass die dTHS+ Gene, deren BiNGO-Netzwerk unter anderem die GO-Gruppen Zelldifferenzierung sowie Blütenentwicklung enthält, ebenso wie die hochregulierten Gene eine wichtige Rolle in der Spezifizierung oder in der Ausdifferenzierung von Gründerzellen einnehmen. Weitere Experimente könnten überprüfen, ob einige dieser Gene direkt von DRNL reguliert werden. Außerdem weisen viele Gene, die für die Einrichtung einer adaxialen-abaxialen Polarität in entstehenden Organen sorgen (4.1.2), eine erhöhte Chromatinzugänglichkeit sowie eine stärkere Expression in den DRNL-exprimierenden Gründerzellen auf.

Es konnte bestätigt werden, dass die identifizierten, zugänglichen Chromatinregionen bereits im IM funktionelle Bedeutung haben und die Chromatinkonfiguration sich in der Genexpression widerspiegelt. Gene mit dTHS+ stehen aufgrund ihrer zugeordneten GO-Gruppen wie Blütenentwicklung sowie Zelldifferenzierung im direkten Zusammenhang mit DRNL bzw. den Gründerzellen.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Die Mehrheit der Gene von *A. thaliana* werden im *ap1cal* IM exprimiert, diese Gene weisen meist zugängliches Chromatin auf im Gegensatz zu den nicht-transkribierten Genen. Dieser Zusammenhang von Genexpression und Chromatinstruktur besteht sowohl in den *DRNL*-exprimierenden (GFP+) Zellen als auch in den übrigen Zellen des IMs (GFP–). An offenes Chromatin können Transkriptionsfaktoren binden und so die Genaktivität regulieren, die häufig am Transkriptionsstart lokalisierten Tn5 Transposase hypersensitiven Stellen (THSs) bieten die Möglichkeit für die Bindung des Präinitiationskomplexes mit nachfolgendem Start der Transkription.

Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit korrelieren nicht nur mit der Genaktivität sondern auch mit zwischen GFP+ und GFP– differenziell regulierten Genen. In den Gründerzellen zugänglichere Gene (dTHS+) werden meist hochreguliert, darunter befinden sich *DRNL* Zielgene wie *AHP6*, wohingegen herunterregulierte Gene eher durch eine höhere Zugänglichkeit in GFP– Zellen (dTHS–) charakterisiert sind. Eine Erhöhung der Transkriptionsrate wird daher von einer Zunahme der Chromatinzugänglichkeit begleitet, wodurch eine zelltyp-spezifische Genexpression erreicht wird. Obwohl nur ein Teil der dTHS Gene auch differenziell exprimiert wird, können Überschneidungen in den Aufgaben der Gene beobachtet werden. Hochregulierte sowie dTHS+ Gene sind unter anderem mit der adaxialen-abaxialen Polarität sowie Blütenentwicklung assoziiert und stehen damit im direkten Zusammenhang zu *DRNL* als Marker der Gründerzellen. Auch in gestressten Protoplasten, die eine verminderte Expression von Blütenentwicklungsgenen aufweisen, können in den Gründerzellen gegenüber dem IM noch aktive Gene der GO-Gruppe Blütenentwicklung gefunden werden, GFP– Zellen sind im Gegensatz zu einem großen Teil mit der Stressantwort beschäftigt. Die *DRNL*-exprimierenden Gründerzellen grenzen sich daher deutlich in ihren Aufgaben von denen des restlichen IMs ab und werden durch spezifisch hochregulierte sowie verstärkt zugängliche Gene, die maßgeblich an der Ausbildung von Blüten beteiligt sind, charakterisiert.

Eine Korrelation der THSs mit DHSs, *DRNL* Zielgenen sowie der Position von AP1 und SEP3 Bindestellen verdeutlicht die hohe Sensitivität von ATAC-Seq und zeigt, dass mittels dieser

Methode im Chromatin *cis*-regulatorische Elemente identifiziert werden können. Gene mit AP1 Bindestellen weisen häufig eine erhöhte Zugänglichkeit in den Gründerzellen auf, im Gegensatz dazu sind SEP3 Bindestellen vermehrt unter den dTHS– Zellen zu finden. Korrespondierend zu der Aufgabe von AP1 im floralen Meristem bzw. der Beteiligung von SEP3 bei der Entwicklung von einzelnen Blütenorganen, werden die Bindestellen der dTHS+ Gene schon früh von AP1 bzw. die SEP3 Bindestellen in dTHS– Genen erst später gebunden. Daraus lässt sich schließen, dass Chromatinregionen bereits zugänglich sein können, obwohl die Besetzung durch einen Transkriptionsfaktor erst zu einem späteren Zeitpunkt erfolgt.

Die Isolation des Transkriptoms von *DRNL*-exprimierenden Zellen zu einem Zeitpunkt, an dem bereits die Blütenblütenbildung histologisch sichtbar wird, könnte Informationen darüber liefern, wie sich die Expression von Genen der Gründerzellen im IM gegenüber dem floralen Meristem verändert. Des Weiteren könnte die Verwendung der *bcm1* Mutante Veränderungen im Transkriptom aufzeigen, wenn *DRNL* nicht an DNA binden kann. Die Implementation eines induzierbaren *DRNL*-Kernimports, optional mit der Unterbindung der Translation mittels Einsatz von Cycloheximid, könnte zur Identifikation von *DRNL*-Zielgenen führen. Da jedes der fünf *DRNL* Zielgene eine THS bzw. dTHS+ aufweist sowie meist hochreguliert wird, könnten weitere Gene, die ebenfalls diese Kriterien erfüllen, überprüft werden, um zusätzliche Zielgene bzw. zusammen mit phylogenetischen Analysen mögliche Bindestellen von *DRNL* zu identifizieren.

## 6 Literatur

- Ackermann, Amanda M.; Zhiping Wang; Jonathan Schug; Ali Naji; und Klaus H. Kaestner. 2016. "Integration of ATAC-Seq and RNA-Seq Identifies Human Alpha Cell and Beta Cell Signature Genes." *Molecular Metabolism* 5 (3). Elsevier GmbH: 233–44.
- Akama, Kazuhito; Holger Puchta; und Barbara Hohn. 1995. "Efficient Agrobacterium-Mediated Transformation of Arabidopsis Thaliana Using the Bar Gene as Selectable Marker." *Plant Cell Reports* 14 (7): 450–54.
- Bao, F.; Junjiang Shen; Shari R. Brady; Gloria K. Muday; Tadao Asami; und Zhenbiao Yang. 2004. "Brassinosteroids Interact with Auxin to Promote Lateral Root Development in Arabidopsis." *Plant Physiology* 134 (4): 1624–31.
- Benfey, Philip N.; und Nam-Hai Chua. 1990. "The Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter: Combinatorial Regulation of Transcription in Plants." *Science*.
- Benjamini, Yoav; und Daniel Yekutieli. 2001. "The Control of the False Discovery Rate in Multiple Testing under Dependency." *The Annals of Statistics* 29 (4): 1165–88.
- Besnard, Fabrice; Yassin Refahi; Valérie Morin; Benjamin Marteaux; Géraldine Brunoud; Pierre Chambrier; Frédérique Rozier; et al. 2014. "Cytokinin Signalling Inhibitory Fields Provide Robustness to Phyllotaxis." *Nature* 505 (7483): 417–21.
- Bhatia, Neha; Behruz Bozorg; André Larsson; Carolyn Ohno; Henrik Jönsson; und Marcus G. Heisler. 2016. "Auxin Acts through MONOPTEROS to Regulate Plant Cell Polarity and Pattern Phyllotaxis." *Current Biology* 26 (23): 3202–8.
- Birnbaum, Kenneth; Jee W. Jung; Jean Y. Wang; Georgina M. Lambert; John A. Hirst; David W. Galbraith; und Philip N. Benfey. 2005. "Cell Type-Specific Expression Profiling in Plants via Cell Sorting of Protoplasts from Fluorescent Reporter Lines." *Nature Methods* 2 (8): 615–19.
- Boffelli, Dario; Jon McAuliffe; Dmitriy Ovcharenko; Keith D. Lewis; Ivan Ovcharenko; Lior Pachter; und Edward M. Rubin. 2003. "Phylogenetic Shadowing of Primate Sequences to Find Functional Regions of the Human Genome." *Science* 299 (5611): 1391–94.

- Bonaccorso, Oliver; Joanne E. Lee; Libby Puah; Charles P. Scutt; und John F. Golz. 2012. "FILAMENTOUS FLOWER Controls Lateral Organ Development by Acting as Both an Activator and a Repressor." *BMC Plant Biology* 12: 176.
- Bowman, John L.; John Alvarez; Detlef Weigel; Elliot M. Meyerowitz; und David R. Smyth. 1993. "Control of Flower Development in *Arabidopsis Thaliana* by APETALA1 and Interacting Genes." *Development* 119: 721–43.
- Brower, Christopher S.; Lucia Veiga; Richard H. Jones; und Alexander Varshavsky. 2010. "Mouse Dfa Is a Repressor of TATA-Box Promoters and Interacts with the Abt1 Activator of Basal Transcription." *Journal of Biological Chemistry* 285 (22): 17218–34.
- Brunoud, Géraldine; Darren M. Wells; Marina Oliva; Antoine Larrieu; Vincent Mirabet; Amy H. Burrow; Tom Beeckman; Stefan Kepinski; Jan Traas; Malcolm J. Bennett; und Teva Vernoux. 2012. "A Novel Sensor to Map Auxin Response and Distribution at High Spatio-Temporal Resolution." *Nature* 482 (7383): 103–6.
- Buenrostro, Jason D.; Paul G. Giresi; Lisa C. Zaba; Howard Y. Chang; und William J. Greenleaf. 2013. "Transposition of Native Chromatin for Fast and Sensitive Epigenomic Profiling of Open Chromatin, DNA-Binding Proteins and Nucleosome Position." *Nature Methods* 10 (12): 1213–18.
- Buenrostro, Jason D.; Beijing Wu; Howard Y. Chang; und William J. Greenleaf. 2015. "ATAC-Seq: A Method for Assaying Chromatin Accessibility Genome-Wide." *Current Protocols in Molecular Biology* 2015 (January): 21.29.1-21.29.9.
- Capua, Yossi; und Yuval Eshed. 2017. "Coordination of Auxin-Triggered Leaf Initiation by Tomato *LEAFLESS*." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 114 (12): 3246–51.
- Carey, Michael. 1998. "The Enhanceosome and Minireview Transcriptional Synergy." *Cell* 92: 5–8.
- Chandler, John W.; Melanie Cole; und Wolfgang Werr. 2008. "The Role of DONROESCHEN (DRN) and DRNL-LIKE (DRNL) in *Arabidopsis* Embryonic Patterning." *Plant Signaling & Behavior* 3:1 (January): 49–51.

- Chandler, John W. 2011. "Founder Cell Specification." *Trends in Plant Science* 16 (11). Elsevier Ltd: 607–13.
- Chandler, John W.; Melanie Cole; Bianca Jacobs; Petra Comelli; und Wolfgang Werr. 2011a. "Genetic Integration of DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE Reveals Hierarchical Interactions in Auxin Signalling and Patterning of the Arabidopsis Apical Embryo." *Plant Molecular Biology* 75 (3): 223–36.
- Chandler, John W.; Bianca Jacobs; Melanie Cole; Petra Comelli; und Wolfgang Werr. 2011b. "DORNROSCHEN-LIKE Expression Marks Arabidopsis Floral Organ Founder Cells and Precedes Auxin Response Maxima." *Plant Molecular Biology* 76 (1–2): 171–85.
- Chandler, John W.; und Wolfgang Werr. 2014. "Arabidopsis Floral Phytomer Development: Auxin Response Relative to Biphasic Modes of Organ Initiation." *Journal of Experimental Botany* 65 (12): 3097–3110.
- Chandler, John W.; und Wolfgang Werr. 2017. "DORNROSCHEN, DORNROSCHEN-LIKE, and PUCHI Redundantly Control Floral Meristem Identity and Organ Initiation in Arabidopsis." *Journal of Experimental Botany* 68 (13): 3457–72.
- Charuvi, Dana; Vladimir Kiss; Reinat Nevo; Eyal Shimoni; Zach Adam; und Ziv Reich. 2012. "Gain and Loss of Photosynthetic Membranes during Plastid Differentiation in the Shoot Apex of Arabidopsis." *The Plant Cell* 24 (3): 1143–57.
- Cheng, Youfa; Xinhua Dai; und Yunde Zhao. 2006. "Auxin Biosynthesis by the YUCCA Flavin Monooxygenases Controls the Formation of Floral Organs and Vascular Tissues in Arabidopsis." *Genes and Development* 20 (13): 1790–99.
- Clough, Steven J.; und Andrew F. Bent. 1998. "Floral Dip: A Simplified Method for Agrobacterium-Mediated Transformation of *Arabidopsis Thaliana*." *Plant Journal* 16 (6): 735–43.
- Coen, Enrico S.; und Elliot M. Meyerowitz. 1991. "The War of the Whorls: Genetic Interactions Controlling Flower Development." *Nature* 353.

- Cole, Melanie; John W. Chandler; Detlef Weijers; Bianca Jacobs; Petra Comelli; und Wolfgang Werr. 2009. "DORNROSCHEN Is a Direct Target of the Auxin Response Factor MONOPTEROS in the Arabidopsis Embryo." *Development* 136 (10): 1643–51.
- Cole, M.; B. Jacobs; L. Soubigou-Taconnat; S. Balzergue; J. P. Renou; J. W. Chandler; und W. Werr. 2013. "Live Imaging of DORNROSCHEN and DORNROSCHEN-LIKE Promoter Activity Reveals Dynamic Changes in Cell Identity at the Microcallus Surface of Arabidopsis Embryonic Suspensions." *Plant Cell Reports* 32 (1): 45–59.
- Comelli, Petra; Dorothea Glowka; John W. Chandler; und Wolfgang Werr. 2016. "Founder-Cell-Specific Transcription of the DORNROSCHEN-LIKE Promoter and Integration of the Auxin Response." *Journal of Experimental Botany* 67 (1): 143–55.
- Conti, Lucio. 2017. "Hormonal Control of the Floral Transition: Can One Catch Them All?" *Developmental Biology* 430 (2): 288–301.
- D'Aloia, Maria; Delphine Bonhomme; Frédéric Bouché; Karim Tamseddak; Sandra Ormenese; Stefano Torti; George Coupland; und Claire Périlleux. 2011. "Cytokinin Promotes Flowering of Arabidopsis via Transcriptional Activation of the FT Parologue TSF." *Plant Journal* 65 (6): 972–79.
- Derelle, E.; C. Ferraz; S. Rombauts; P. Rouze; A. Z. Worden; S. Robbens; F. Partensky; et al. 2006. "Genome Analysis of the Smallest Free-Living Eukaryote *Ostreococcus Tauri* Unveils Many Unique Features." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103 (31): 11647–52.
- Ditta, Gary; Anusak Pinyopich; Pedro Robles; Soraya Pelaz; und Martin F. Yanofsky. 2004. "The SEP4 Gene of Arabidopsis Thaliana Functions in Floral Organ and Meristem Identity." *Current Biology* 14.
- Dolzblasz, Alicja; Elwira Smakowska; Edyta M. Gola; Katarzyna Sokolowska; Marta Kicia; und Hanna Janska. 2016. "The Mitochondrial Protease AtFTSH4 Safeguards Arabidopsis Shoot Apical Meristem Function." *Scientific Reports* 6. Nature Publishing Group: 1–14.



- Eklund, D. M.; I. Cierlik; V. Staldal; A. R. Claes; D. Vestman; J. Chandler; und E. Sundberg. 2011. "Expression of Arabidopsis SHORT INTERNODES/STYLISH Family Genes in Auxin Biosynthesis Zones of Aerial Organs Is Dependent on a GCC Box-Like Regulatory Element." *Plant Physiology* 157 (4): 2069–80.
- Emery, John F.; Sandra K. Floyd; John Alvarez; Yuval Eshed; Nathaniel P. Hawker; Anat Izhaki; Stuart F. Baum; und John L. Bowman. 2003. "Radial Patterning of Arabidopsis Shoots by Class III HD-ZIP and KANADI Genes." *Current Biology* 13 (20): 1768–74.
- Engelhorn, Julia; Robert Blanvillain; Christian Kröner; Hugues Parrinello; Marine Rohmer; David Posé; Felix Ott; Markus Schmid; und Cristel Carles. 2017. "Dynamics of H3K4me3 Chromatin Marks Prevails over H3K27me3 for Gene Regulation during Flower Morphogenesis in Arabidopsis Thaliana." *Epigenomes* 1 (3): 8.
- Ferreira, Fernando J.; und Joseph J. Kieber. 2005. "Cytokinin Signaling." *Current Opinion in Plant Biology* 8 (5): 518–25.
- Franco-Zorrilla, José M.; Irene López-Vidriero; José L. Carrasco; Marta Godoy; Pablo Vera; und Roberto Solano. 2014. "DNA-Binding Specificities of Plant Transcription Factors and Their Potential to Define Target Genes." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 111 (6): 2367–72.
- Frerichs, Anneke; Rahere Thoma; Ali Taleb Abdallah; Peter Frommolt; Wolfgang Werr; und John William Chandler. 2016. "The Founder-Cell Transcriptome in the Arabidopsis Apetala1 Cauliflower Inflorescence Meristem." *BMC Genomics* 17 (1). BMC Genomics: 1–18.
- Fukushima, Kenji; und Mitsuyasu Hasebe. 2014. "Adaxial-Abaxial Polarity: The Developmental Basis of Leaf Shape Diversity." *Genesis* 52 (1): 1–18.
- Guilfoyle, Tom J.; Tim Ulmasov; und Gretchen Hagen. 1998. "The ARF Family of Transcription Factors and Their Role in Plant Hormone-Responsive Transcription." *CMLS - Cellular and Molecular Life Sciences* 54 (7): 619–27.

- Ha, Chan Man; Ji Hyung Jun; Hong Gil Nam; und Jennifer C. Fletcher. 2007. "BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 Control *Arabidopsis* Lateral Organ Fate through Regulation of LOB Domain and Adaxial-Abaxial Polarity Genes." *The Plant Cell* 19 (6): 1809–25.
- Herzenberg, Leonard A.; Richard G. Sweet; und Leonore A. Herzenberg. 1976. "Fluorescence-Activated Cell Sorting." *Scientific American* 234: 108–18.
- Higuchi, Russell; Carita Fockler; Gavin Dollinger; und Robert Watson. 1993. "Kinetic PCR Analysis: Real-Time Monitoring of DNA Amplification Reactions." *Nature Biotechnology*.
- Honma, Takashi; und Koji Goto. 2001. "Complexes of MADS-Box Proteins Are Sufficient to Convert Leaves into Floral Organs." *Nature* 409 (January): 525–29.
- Ikedo, Yoshihisa; Hiroharu Banno; Qi Wen Niu; Stephen H. Howell; und Nam Hai Chua. 2006. "The ENHANCER of SHOOT REGENERATION 2 Gene in *Arabidopsis* Regulates CUP-SHAPED COTYLEDON 1 at the Transcriptional Level and Controls Cotyledon Development." *Plant and Cell Physiology* 47 (11): 1443–56.
- Isakova, Alina; Romain Groux; Michael Imbeault; Pernille Rainer; Daniel Alpern; Riccardo Dainese; Giovanna Ambrosini; Didier Trono; Philipp Bucher; und Bart Deplancke. 2017. "SMiLE-Seq Identifies Binding Motifs of Single and Dimeric Transcription Factors." *Nature Methods* 14 (3): 316–22.
- Jack, Thomas. 2001. "Relearning Our ABCs: New Twists on an Old Model." *Trends in Plant Science* 6 (7): 310–16.
- Kaufmann, Kerstin; Jose M. Muiño; Magne Østerås; Laurent Farinelli; Pawel Krajewski; und Gerco C. Angenent. 2010a. "Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) of Plant Transcription Factors Followed by Sequencing (ChIP-SEQ) or Hybridization to Whole Genome Arrays (ChIP-CHIP)." *Nature Protocols* 5 (3): 457–72.
- Kaufmann, Kerstin; Frank Wellmer; Jose M. Muiñ; Thilia Ferner; Samuel E. Wuest; Vijaya Kumar; Antonio Serrano-Mislata; Francisco Madueño; Pawel Kraiewski; Elliot M. Meyerowitz; Gerco C. Angenent; und José Luis Riechmann. 2010b. "Orchestration of Floral Initiation by APETALA1." *Science* 328 (5974): 85–89.

- Khan, Madiha; Mingli Xu; Jhadeswar Murmu; Paul Tabb; Yuanyuan Liu; Kathryn Storey; Sarah M. McKim; Carl J. Douglas; und Shelley R. Hepworth. 2012. "Antagonistic Interaction of BLADE-ON-PETIOLE1 and 2 with BREVIPEDICELLUS and PENNYWISE Regulates Arabidopsis Inflorescence Architecture." *Plant Physiology* 158 (2): 946–60.
- Kibbe, Warren A. 2007. "OligoCalc: An Online Oligonucleotide Properties Calculator." *Nucleic Acids Research* 35 (SUPPL.2): 43–46.
- Kirch, Thomas; Rüdiger Simon; Margit Grünewald; und Wolfgang Werr. 2003. "The DORNROSCHE/ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1 Gene of Arabidopsis Acts in the Control of Meristem Cell Fate and Lateral Organ Development." *The Plant Cell* 15 (March): 694–705.
- Koncz, Csaba; und Jeff Schell. 1986. "The Promoter of TL-DNA Gene 5 Controls the Tissue-Specific Expression of Chimaeric Genes Carried by a Novel Type of Agrobacterium Binary Vector." *MGG Molecular & General Genetics* 204 (3): 383–96.
- Kudo, Toru; Takatoshi Kiba; und Hitoshi Sakakibara. 2010. "Metabolism and Long-Distance Translocation of Cytokinins." *Journal of Integrative Plant Biology* 52 (1): 53–60.
- Kundaje, Anshul; Sofia Kyriazopoulou-Panagiotopoulou; Max Libbrecht; Cheryl L. Smith; Debasish Raha; Elliott E. Winters; Steven M. Johnson; Michael Snyder; Serafim Batzoglou; und Arend Sidow. 2012. "Ubiquitous Heterogeneity and Asymmetry of the Chromatin Environment at Regulatory Elements." *Genome Research* 22 (9): 1735–47.
- Lavy, Meirav; und Mark Estelle. 2016. "Mechanisms of Auxin Signaling." *Development* 143 (18): 3226–29.
- Leibfried, Andrea; Jennifer P.C. To; Wolfgang Busch; Sandra Stehling; Andreas Kehle; Monika Demar; Joseph J. Kieber; und Jan U. Lohmann. 2005. "WUSCHEL Controls Meristem Function by Direct Regulation of Cytokinin-Inducible Response Regulators." *Nature* 438 (7071): 1172–75.
- Lindquist, Susan 1986. "The Heat-Shock Response." *Annual Review of Biochemistry* 55 (1): 1151–91.

- Lister, Ryan; Ronan C. O'Malley; Julian Tonti-Filippini; Brian D. Gregory; Charles C. Berry; A. Harvey Millar; und Joseph R. Ecker. 2008. "Highly Integrated Single-Base Resolution Maps of the Epigenome in Arabidopsis." *Cell* 133 (3): 523–36.
- Liu, Zhan-Bin; Tim Ulmasov; Xiangyang Shi; Gretchen Hagen; und Tom J. Guilfoyle. 1994. "Soybean GH3 Promoter Contains Multiple Auxin-Inducible Elements." *The Plant Cell* 6 (5): 645–57.
- Livak, Kenneth J.; und Thomas D. Schmittgen. 2001. "Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT Method." *Methods* 25 (4): 402–8.
- Lloyd, a M; M Schena; V Walbot; und R W Davis. 1994. "Epidermal Cell Fate Determination in Arabidopsis: Patterns Defined by a Steroid-Inducible Regulator." *Science* 266 (5184): 436–39.
- Love, Michael I.; Wolfgang Huber; und Simon Anders. 2014. "Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2." *Genome Biology* 15 (12): 1–21.
- Lu, Zefu; Brigitte T. Hofmeister; Christopher Vollmers; Rebecca M. DuBois; und Robert J. Schmitz. 2016. "Combining ATAC-Seq with Nuclei Sorting for Discovery of Cis-Regulatory Regions in Plant Genomes." *Nucleic Acids Research* 45 (6): 1–13.
- Madrigal, Pedro. 2015. "On Accounting for Sequence-Specific Bias in Genome-Wide Chromatin Accessibility Experiments: Recent Advances and Contradictions." *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology* 3 (September): 1–4.
- Maere, Steven; Karel Heymans; und Martin Kuiper. 2005. "BiNGO: A Cytoscape Plugin to Assess Overrepresentation of Gene Ontology Categories in Biological Networks." *Bioinformatics* 21 (16): 3448–49.

- Maher, Kelsey A; Marko Bajic; Kaisa Kajala; Mauricio Reynoso; Germain Pauluzzi; Donnelly West; Kristina Zumstein; Margaret Woodhouse; Kerry L Bubb; Michael W Dorrity; Christine Queitsch; Julia Bailey-Serres; Neelima Sinha; Siobhan M. Brady; und Roger Deal. 2017. "Profiling of Accessible Chromatin Regions across Multiple Plant Species and Cell Types Reveals Common Gene Regulatory Principles and New Control Modules." *The Plant Cell* 30 (January): tpc.00581.2017.
- Mähönen, Ari Pekka; Anthony Bishopp; Masayuki Higuchi; Kaisa M. Nieminen; Kaori Kinoshita; Kirsi Törmäkangas; Yoshihisa Ikeda; Atsuhiko Oka; Tatsuo Kakimoto; und Ykä Helariutta. 2006. "Cytokinin Signaling and Its Inhibitor AHP6 Regulate Cell Fate during Vascular Development." *Science* 311 (5757): 94–98.
- Mandel, Alejandra M.; Cindy Gustafson-Brown; Beth Savidge; und Martin F. Yanofsky. 1992. "Molecular Characterization of the Arabidopsis Floral Homeotic Gene APETALA1." *Nature* 355: 472–75.
- Mardis, Elaine R. 2008. "The Impact of Next-Generation Sequencing Technology on Genetics." *Trends in Genetics* 24 (3): 133–41.
- Matsumoto, Noritaka; und Kiyotaka Okada. 2001. "A Homeobox Gene, PRESSED FLOWER, Regulates Lateral Axis-Dependent Development of Arabidopsis Flowers." *Genes & Development*, 3355–64.
- Morin, Ryan D.; Matthew Bainbridge; Anthony Fejes; Martin Hirst; Martin Krzywinski; Trevor J. Pugh; Helen McDonald; Richard Varhol; Steven J.M. Jones; und Marco A. Marra. 2008. "Profiling the HeLa S3 Transcriptome Using Randomly Primed CDNA and Massively Parallel Short-Read Sequencing." *BioTechniques* 45 (1): 81–94.
- Müller, Bruno; und Jen Sheen. 2007. "Arabidopsis Cytokinin Signaling Pathway." *Science's STKE* 2007 (407).
- Mullis, Kary B.; Henry A. Erlich; Norman Arnheim; Glenn T. Horn; Randall K. Saiki; und Stephen J. Scharf. 1987. "Process for Amplifying, Detecting, and/or-Cloning Nucleic Acid Sequences." *United States Patent*, no. 19.

- Murakami, Kenji; Kuang-Lei Tsai; Nir Kalisman; David A. Bushnell; Francisco J. Asturias; und Roger D. Kornberg. 2015. "Structure of an RNA Polymerase II Preinitiation Complex." *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112 (44): 13543–48.
- Nag, Anwesha; Yingzhen Yang; und Thomas Jack. 2007. "DORNROSCHE-LIKE, an AP2 Gene, Is Necessary for Stamen Emergence in Arabidopsis." *Plant Molecular Biology* 65 (3): 219–32.
- Odell, Joan T.; Susan Knowlton; Willy Lin; und C. Jeffry Mauvais. 1988. "Properties of an Isolated Transcription Stimulating Sequence Derived from the Cauliflower Mosaic Virus 35S Promoter." *Plant Molecular Biology* 10 (3): 263–72.
- Okada, Kiyotaka; und Yoshiro Shimira. 1994. "Genetic Analysis of Signalling Flower Development Using Arabidopsis." *Plant Molecular Biology* 26 (5): 1357–77.
- Orlando, Valerio; und Renato Paro. 1993. "Mapping Polycomb-Repressed Domains in the Bithorax Complex Using in Vivo Formaldehyde Cross-Linked Chromatin." *Cell* 75 (6): 1187–98.
- Otsuga, Denichiro; Bernadette DeGuzman; Michael J. Prigge; Gary N. Drews; und Steven E. Clark. 2001. "REVOLUTA Regulates Meristem Initiation at Lateral Positions." *Plant Journal* 25 (2): 223–36.
- Pajoro, Alice; Pedro Madrigal; Jose M Muiño; José Tomás Matus; Jian Jin; Martin A Mecchia; Juan M Debernardi; Javier F Palatnik; Salma Balazadeh; Muhammad Arif; Diarmuid S Ó Maoiléidigh; Frank Wellmer; Pawel Krajewski; José-luis Riechmann; Gerco C Angenent; und Kerstin Kaufmann. 2014. "Dynamics of Chromatin Accessibility and Gene Regulation by MADS-Domain Transcription Factors in Flower Development Dynamics of Chromatin Accessibility and Gene Regulation by MADS-Domain Transcription Factors in Flower Development." *Genome Biology*.
- Pandey, Shashank K; Han Woo Lee; Min-Jung Kim; Chuloh Cho; Eunkyoo Oh; und Jungmook Kim. 2018. "LBD18 Utilizes a Dual Mode of a Positive Feedback Loop to Regulate ARF Expression and Transcriptional Activity in Arabidopsis." *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology*, 1–19.

- Panne, Daniel. 2008. "The Enhanceosome." *Current Opinion in Structural Biology* 18 (2): 236–42.
- Pekárová, Blanka; Agnieszka Szmitkowska; Radka Dopitová; Oksana Degtjarik; Lukáš Žídek; und Jan Hejátko. 2016. "Structural Aspects of Multistep Phosphorelay-Mediated Signaling in Plants." *Molecular Plant* 9 (1): 71–85.
- Pelaz, Soraya; Gary S. Ditta; Elvira Baumann; Ellen Wisman; und Martin F. Yanofsky. 2000. "B and C Floral Organ Identity Functions Require SEPALLATA MADS-Box Genes." *Nature* 405 (6783): 200–203.
- Picard, Didier; Stephen J. Salser; und Keith R. Yamamoto. 1988. "A Movable and Regulable Inactivation Function within the Steroid Binding Domain of the Glucocorticoid Receptor." *Cell* 54 (7): 1073–80.
- Pils, Birgit; und Alexander Heyl. 2009. "Unraveling the Evolution of Cytokinin Signaling." *Plant Physiology* 151 (2): 782–91.
- Piovesan, Allison; Maria Caracausi; Francesca Antonaros; Maria Chiara Pelleri; und Lorenza Vitale. 2016. "GeneBase 1.1: A Tool to Summarize Data from NCBI Gene Datasets and Its Application to an Update of Human Gene Statistics." *Database* 2016 (June 2018): 1–13.
- Rehimi, R.; M. Bartusel; F. Solinas; J. Altmüller; und A Rada-Iglesias. 2017. "Chromatin Immunoprecipitation (ChIP) Protocol for Low-Abundance Embryonic Samples." *Journal of Visualized Experiments*.
- Reinhardt, D; Eva-Rachele Pesce<sup>1</sup>; Pia Stieger; Therese Mandel; Kurt Baltensperger; Malcolm Bennett; Jan Traas; Jir'í Friml; und Cris Kuhlemeier. 2003. "Regulation of Phyllotaxis by Polar Auxin Transport." *Nature* 426: 1–14.
- Ren, Bo; Yan Liang; Yan Deng; Qingguo Chen; Jian Zhang; Xiaohui Yang; und Jianru Zuo. 2009. "Genome-Wide Comparative Analysis of Type-A Arabidopsis Response Regulator Genes by Overexpression Studies Reveals Their Diverse Roles and Regulatory Mechanisms in Cytokinin Signaling." *Cell Research* 19 (10). Nature Publishing Group: 1178–90.

- Schena, Mark; Dari Shalon; Ronald W. Davis; und Patrick O. Brown. 1995. "Quantitative Monitoring of Gene Expression Patterns with a Complementary DNA Microarray." *Science* 270 (5235): 467–70.
- Schnittger, Arp; und Lieven De Veylder. 2018. "The Dual Face of Cyclin B1." *Trends in Plant Science* 23 (6). Elsevier Ltd: 475–78.
- Schoof, Heiko; Michael Lenhard; Achim Haecker; Klaus F. X. Mayer; Gerd Jürgens; und Thomas Laux. 2000. "The Stem Cell Population Of Arabidopsis Shoot Meristems Is Maintained by a Regulatory Loop between The CLAVATA And WUSCHEL Genes." *Cell* 100 (6): 635–644.
- Seeliger, Ingo; Anneke Frerichs; Dorothea Glowa; Laura Velo; Petra Comelli; John W. Chandler; und Wolfgang Werr. 2016. "The AP2-Type Transcription Factors DORNROSCHE and DORNROSCHE-LIKE Promote G1/S Transition." *Molecular Genetics and Genomics* 291 (5). Springer Berlin Heidelberg: 1835–49.
- Sessions, Allen; Jennifer L. Nemhauser; Andy McColl; Judith L. Roe; Ken A. Feldmann; und Patricia C. Zambryski. 1997. "ETTIN Patterns the Arabidopsis Floral Meristem and Reproductive Organs." *Development* 124 (22): 4481–91.
- Shannon, Paul; Andrew Markiel; 2 Owen Ozier; Nitin S. Baliga; Jonathan T. Wang; Daniel Ramage; Nada Amin; Benno Schwikowski; und Trey Ideker. 2003. "Cytoscape: A Software Environment for Integrated Models of Biomolecular Interaction Networks." *Genome Research*, no. 13: 2498–2504.
- Siegfried, Kellee R.; Yuval Eshed; Stuart F. Baum; Denichiro Otsuga; Gary N. Drews; und John L. Bowman. 1999. "Members of the YABBY Gene Family Specify Abaxial Cell Fate in Arabidopsis." *Development* 126 (18): 4117–28.
- Sijacic, Paja; Marko Bajic; Elizabeth C. McKinney; Richard B. Meagher; und Roger B. Deal. 2018. "Changes in Chromatin Accessibility between Arabidopsis Stem Cells and Mesophyll Cells Illuminate Cell Type-Specific Transcription Factor Networks." *Plant Journal* 94 (2): 215–31.



- Simon, Jeremy M.; Paul G. Giresi; Ian J. Davis; und Jason D. Lieb. 2012. "Using Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE) to Isolate Active Regulatory DNA." *Nature Protocols* 7 (2): 256–67.
- Solomon, Mark J.; Pamela L. Larsen; und Alexander Varshavsky. 1988. "Mapping ProteinDNA Interactions in Vivo with Formaldehyde: Evidence That Histone H4 Is Retained on a Highly Transcribed Gene." *Cell* 53 (6): 937–47.
- Somerville, Chris; und Maarten Koornneef. 2002. "A Fortunate Choice: The History of *Arabidopsis* as a Model Plant." *Nature Reviews. Genetics* 3 (11): 883–89.
- Song, Lingyun; und Gregory E. Crawford. 2010. "DNase-Seq: A High-Resolution Technique for Mapping Active Gene Regulatory Elements across the Genome from Mammalian Cells." *Cold Spring Harbor Protocols* 5 (2): 1–12.
- Teif, Vladimir B.; und Karsten Rippe. 2011. "Calculating Transcription Factor Binding Maps for Chromatin." *Briefings in Bioinformatics* 13 (2): 187–201.
- The Arabidopsis Genome Initiative. 2000. "Analysis of the Genome Sequence of the Flowering Plant *Arabidopsis Thaliana*." *Nature* 408 (December): 796–815.
- Thoma, Rahere; und John William Chandler. 2015. "Polarity in the Early Floral Meristem of *Arabidopsis*." *Plant Signaling and Behavior* 10 (4): 1–6.
- Thomas, Mary C.; und Cheng Ming Chiang. 2006. "The General Transcription Machinery and General Cofactors." *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 41 (3): 105–78.
- Trapnell, Cole; Adam Roberts; Loyal Goff; Geo Pertea; Daehwan Kim; David R. Kelley; Harold Pimentel; Steven L. Salzberg; John L. Rinn; und Lior Pachter. 2012. "Differential Gene and Transcript Expression Analysis of RNA-Seq Experiments with TopHat and Cufflinks." *Nature Protocols* 7 (3). Nature Publishing Group: 562–78.
- Überlacker, Bärbel; und Wolfgang Werr. 1996. "Vectors with Rare-Cutter Restriction Enzyme Sites for Expression of Open Reading Frames in Transgenic Plants." *Molecular Breeding* 2 (3): 293–95.

- Ulmasov, Tim; Jane Murfett; Gretchen Hagen; und Tom J Guilfoyle. 1997. "Creation of a Highly Active Synthetic AuxRE." *Society* 9 (November): 1963–71.
- Wagle, Prerana; Miloš Nikolić; und Peter Frommolt. 2015. "QuickNGS Elevates Next-Generation Sequencing Data Analysis to a New Level of Automation." *BMC Genomics* 16 (1): 1–8.
- Waldie, Tanya; und Ottoline Leyser. 2018. "Cytokinin Targets Auxin Transport to Promote Shoot Branching." *Plant Physiology* 177 (June): pp.01691.2017.
- Weigel, Detlef; John Alvarez; David R. Smyth; Martin F. Yanofsky; und Elliot M. Meyerowitz. 1992. "LEAFY Controls Floral Meristem Identity in Arabidopsis." *Cell* 69 (5): 843–59.
- Wen-Jun, Shen; und Brian G. Forde. 1989. "Efficient Transformation of *Agrobacterium* Spp. by High Voltage Electroporation." *Nucleic Acids Research* 17 (20): 8385.
- Wu, Gang; Wan-Ching Lin; Tengbo Huang; R Scott Poethig; Patricia S Springer; und Randall a Kerstetter. 2008. "KANADI1 Regulates Adaxial-Abaxial Polarity in Arabidopsis by Directly Repressing the Transcription of ASYMMETRIC LEAVES2." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105 (42): 16392–97.
- Yamaguchi, Nobutoshi; Ayako Yamaguchi; Mitsutomo Abe; Doris Wagner; und Yoshiyumi Komeda. 2012. "LEAFY Controls Arabidopsis Pedicel Length and Orientation by Affecting Adaxial-Abaxial Cell Fate." *Plant Journal* 69 (5): 844–56.
- Zang, Chongzhi; Dustin E. Schones; Chen Zeng; Kairong Cui; Keji Zhao; und Weiqun Peng. 2009. "A Clustering Approach for Identification of Enriched Domains from Histone Modification ChIP-Seq Data." *Bioinformatics* 25 (15): 1952–58.
- Zeng, Ping Yao; Christopher R. Vakoc; Zhu Chu Chen; Gerd A. Blobel; und Shelley L. Berger. 2006. "In Vivo Dual Cross-Linking for Identification of Indirect DNA-Associated Proteins by Chromatin Immunoprecipitation." *BioTechniques* 41 (6): 694–98.
- Zhang, Yong; Tao Liu; Clifford A. Meyer; Jérôme Eeckhoute; David S. Johnson; Bradley E. Bernstein; Chad Nussbaum; Richard M. Myers; Myles Brown; Wei Li; und X. Shirley Shirley. 2008. "Model-Based Analysis of ChIP-Seq (MACS)." *Genome Biology* 9 (9).

- Zhang, Wenjing; Jennifer P.C. To; Chia Yi Cheng; G. Eric Schaller; und Joseph J. Kieber. 2011. "Type-A Response Regulators Are Required for Proper Root Apical Meristem Function through Post-Transcriptional Regulation of PIN Auxin Efflux Carriers." *Plant Journal* 68 (1): 1–10.
- Zhang, Tao; Wenli Zhang; und Jiming Jiang. 2015. "Genome-Wide Nucleosome Occupancy and Positioning and Their Impact on Gene Expression and Evolution in Plants." *Plant Physiology* 168 (4): 1406–16.
- Zhao, Zhong; Stig U. Andersen; Karin Ljung; Karel Dolezal; Andrej Miotk; Sebastian J. Schultheiss; und Jan U. Lohmann. 2010. "Hormonal Control of the Shoot Stem-Cell Niche." *Nature* 465 (7301). Nature Publishing Group: 1089–92.
- Zhong, Jianling; Kaixuan Luo; Peter S. Winter; Gregory E. Crawford; Edwin S. Iversen; und Alexander J. Hartemink. 2018. "Mapping Nucleosome Positions Using DNase-Seq." *Genome Research* 26 (3): 351–64.
- Zürcher, Evelyne; Jingchun Liu; Martin di Donato; Markus Geisler; und Bruno Müller. 2016. "Plant Development Regulated by Cytokinin Sinks." *Science* 3394 (2006): 3391–94.

## 7 Anhang A

### 7.1 Liste der verwendeten Primer

**Tabelle 7: Liste der verwendeten Primer**

Die aufgeführten Primer wurden in Genotypisierungsexperimenten sowie zur Bestätigung von RNA- bzw. ChIP-Seq Ergebnissen verwendet. Die Bezeichnung und die entsprechende DNA-Sequenz jedes Primers sowie die Größe des Amplikons in bp, die Primereffizienz und die eingestellte Hybridisierungstemperatur der Primerpaare sind aufgeführt. Das Kürzel FP („forward primer“) bzw. RP („reverse primer“) beschreibt die Orientierung des Primers in Bezug auf das Gen von Interesse.

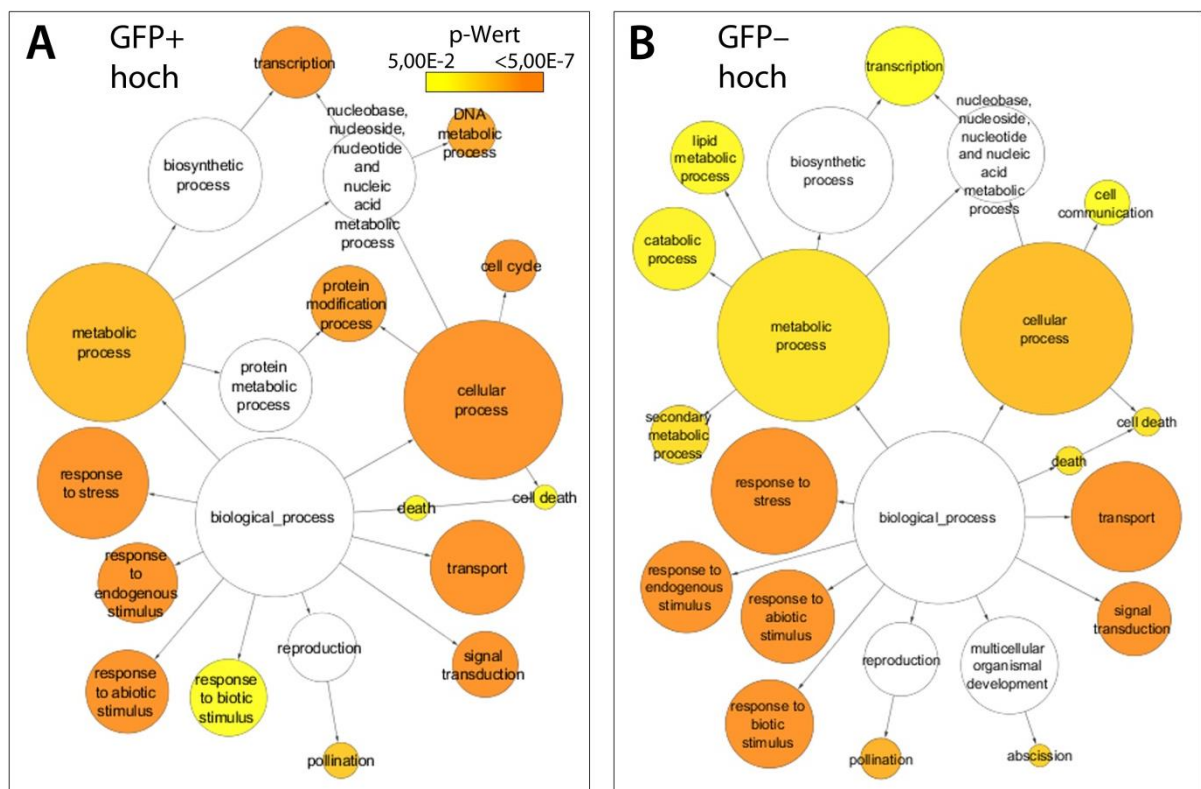
Bezeichnung	DNA-Sequenz	Amplikon- größe [bp]	Primereffi- zienz [%]	Hybridisierungs- temperatur [°C]
<u>Genotypisierung</u>				
DRNL-GR FP	CGACGTTGTTACGAGTCCT	482		55
DRNL-GR RP	CAGTGGCTTGCTGAATCCCT			
<u>Bestätigung der RNA-Seq Ergebnisse</u>				
Actin2 FP	GTGTTGTTAGCAACTGGGATGA	80	99,12	60
Actin2 RP	CTCTTCAGGAGCAATACGAAGC			
AHP6 FP	CCGCAACCTTAGATTATTGTTGAT	110	107,36	60
AHP6 RP	CCCTACGAGCACCAATGC			
ARR9 FP	TCGCAACCGCTGTCTGATCT	131	115,84	60
ARR9 RP	TCCCCTCTCTGCATTCCCTACT			
BOP2 FP	CGTACCCGCTAGCCCAACAA	135	102,44	60
BOP2 RP	TGTTTCTGCGGCACGATGGA			
CYCB1;1 FP	TGTGCAAAGCTGTTGGCGTA	123	115,06	60
CYCB1;1 RP	AGGGATCAAAGCCACAGCGA			
DRNL FP	GGTCAAGTACCATTGAGAACGA	104	105,40	60
DRNL RP	TTTTGGTAAGAAGCCTTGAACA			
Ga3ox3 FP	TCTGGTCCAAACCCGAACCC	108	101,37	60
Ga3ox3 RP	CACCCCATTCCTCACAGGCT			
HSP70 FP	CAGACAACCAGCCCGGTGTA	122	96,83	60
HSP70 RP	CGGTACACCTCGTGAGCAG			
IAA20 FP	ACGGACCTGAGACTCGGACT	115	99,55	60
IAA20 RP	CCGCCACATATTCCGCATCC			
KNAT1 FP	CAACAGCGGTCAACACCGTC	115	95,14	60
KNAT1 RP	TGGGCCTTGTTAGCTCCTCAC			
LEAFY FP	TTCAAGCACCACTCCGGTT	137	78,10	60
LEAFY RP	CTTCGCCGCCGTGTAGAAAC			
MP FP	AACCGCCAACCGTACTCCTT	113	105,60	60
MP RP	CTGAGAGCTGAGACCCGCAT			
NRT1.7 FP	CTTCCCTTCTACGACCGCGT	135	136,43	60
NRT1.7 RP	CACAATGCCCGCAACGATCA			
PRS FP	TGGCTTCAACGAGGTGGTGT	120	111,41	60
PRS RP	ACGCCAAGTGAGCTGTGATCT			
PUCHI FP	TGCATTGTCCCAAACCACTGC	100	117,95	60

PUCHI RP	AGGCTTTGCTTGCTACCGGA			
ROXY1 FP	AGAGCGCGGTGGTGATCTTC	142	123,63	60
ROXY1 RP	ATGAGGGCTCGCTGGATGTC			
STY1 FP	CGCGGTGAGAGCGTTCTCTAA	135	110,92	60
STY1 RP	CACCGCCGATGAACTCACCT			
WOX4 FP	AGGACATGTAGGAGCTGGGGAT	125	122,90	60
WOX4 RP	AGAGGAAAAAGCTCGAGGGTTACA			
YAB1 FP	TCCGATGTGGTTGCTGTACCA	144	113,08	60
YAB1 RP	ACGGTGCATCTCTCAGCTCC			

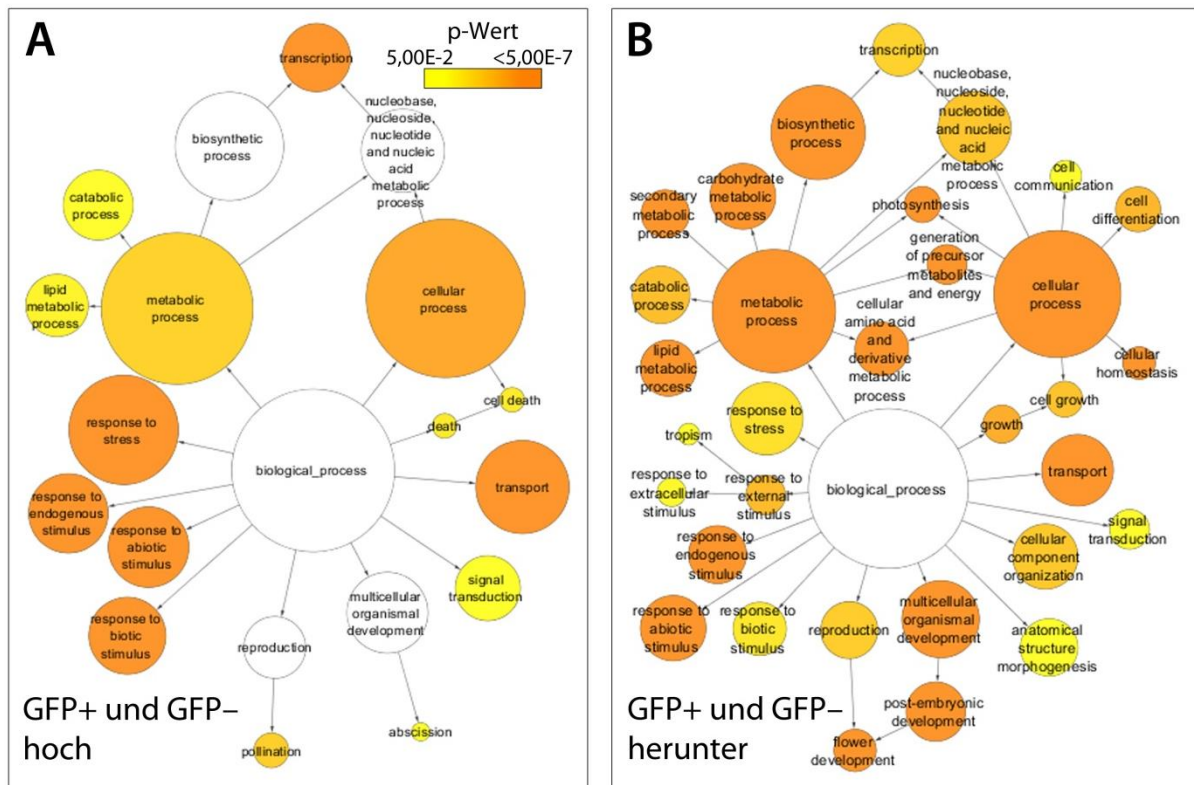
#### Bestätigung der ChIP-Methode

AP2 FP	TCATATATGTCGCATAACGAGGGAGT	100		60
AP2 RP	TGCTCATATAAAACAAAACCAAAGAAACA			
FD FP 1	TATCTTCTTTTGGCCCAATTTCAATT	100		60
FD RP 1	TTGGTTGCTTAAAAGAATACACAGCA			
TOE1 FP	ACTTTTGTGCCCTTTCCCAT	144		60
TOE1 RP	AGGTAACGAGGAGACCCATT			

## 7.2 GO-Netzwerke von GFP+ und GFP– Zellen im Vergleich zum IM

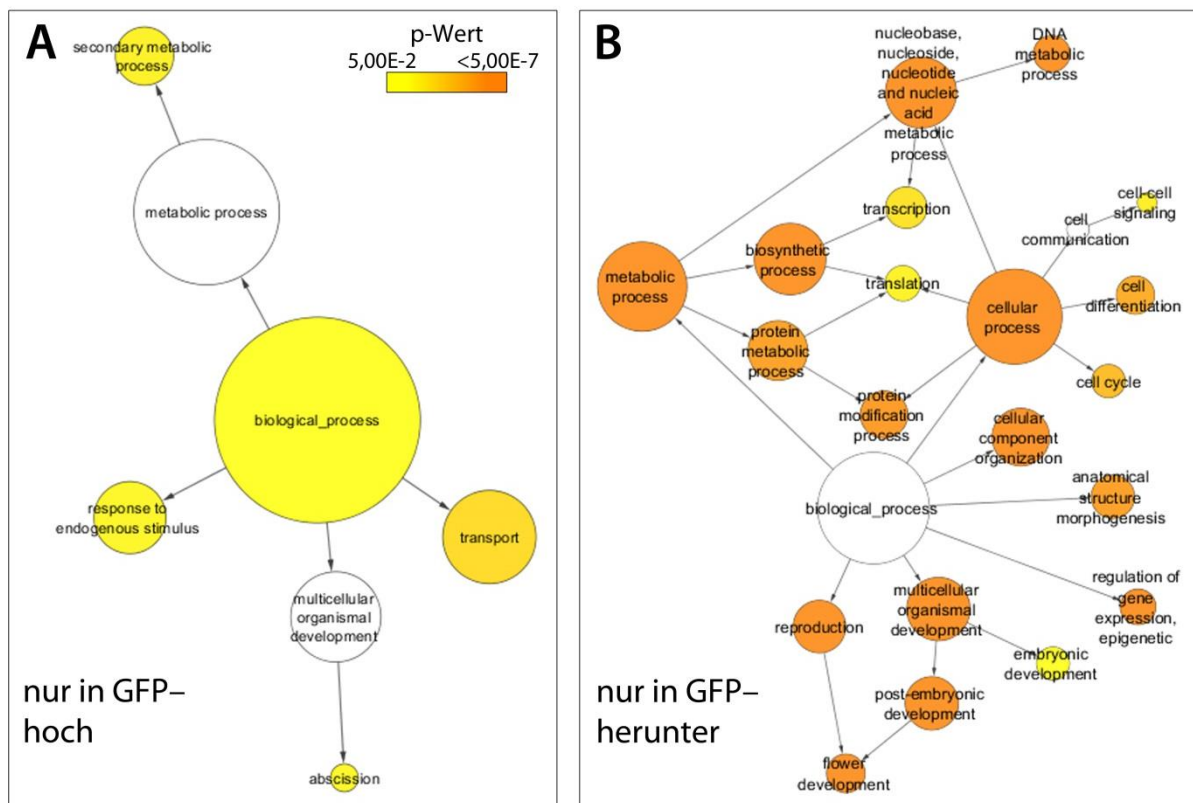


**Abbildung 28: GO-Netzwerk von hochregulierten Genen in GFP+ oder GFP– Zellen im Vergleich zum Infloreszenzmeristem**  
Die Einordnung der Gene in funktionelle GO-Gruppen erfolgte mittels BiNGO für die hochregulierten (FPKM  $\geq 1$ ; FC  $\geq 1,5$ ; p-Wert  $\leq 0,01$ ) Gene in GFP+ (A) oder GFP– (B) Zellen gegenüber Infloreszenzmeristemzellen. Eine im Vergleich zu einer statistischen Verteilung erhöhte Anzahl an Genen in einer GO-Gruppe wird bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant angesehen und farblich markiert.



**Abbildung 29: GO-Netzwerk von Genen, die in GFP+ und GFP- Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem gleich differenziell transkribiert werden**

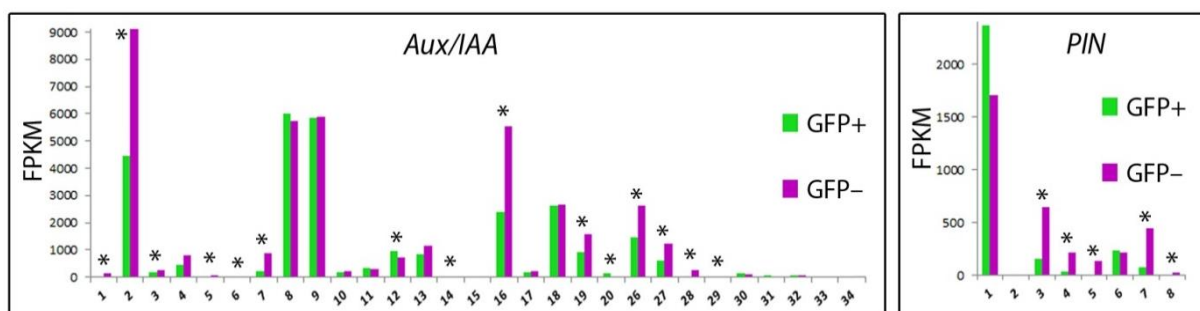
Die Einordnung der Gene in funktionelle GO-Gruppen erfolgte mittels BINGO für die gemeinsam in GFP+ und GFP- Zellen gegenüber Infloreszenzmeristemzellen hoch-(A) bzw. herunterregulierten (B) Gene (FPKM  $\geq 1$ ; FC  $\geq 1,5$ ; p-Wert  $\leq 0,01$ ). Eine im Vergleich zu einer statistischen Verteilung erhöhte Anzahl an Genen in einer GO-Gruppe wird bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant angesehen und farblich markiert.



**Abbildung 30: GO-Netzwerk von Genen, die nur in GFP+ Zellen gegenüber dem Infloreszenzmeristem differenziell transkribiert werden**

Eine Zuordnung der nur in GFP+ Zellen hoch- (A) bzw. herunterregulierten (B) Gene im Vergleich zum Infloreszenzmeristem erfolgte mittels BiNGO. Eine statistischen Überrepräsentation an Genen in einer GO-Gruppe wird bei einem p-Wert  $\leq 0,05$  als signifikant angesehen und farblich markiert.

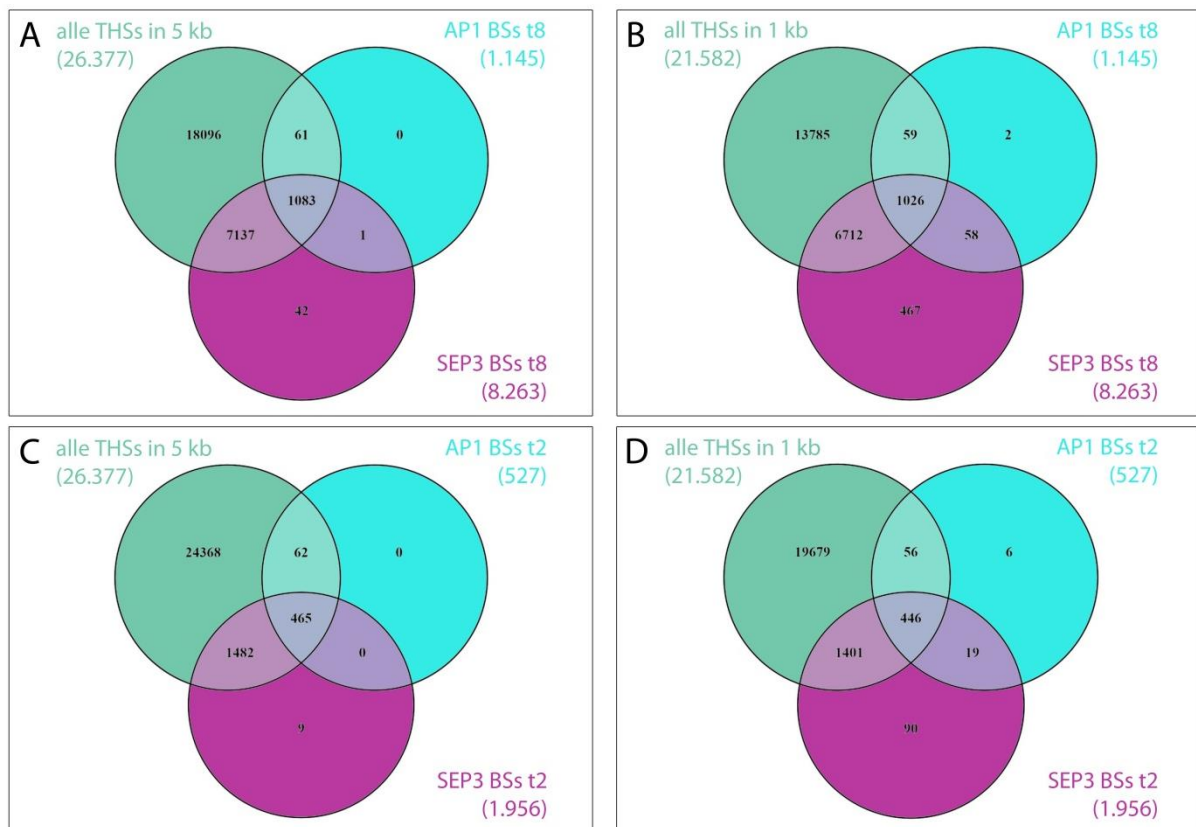
### 7.3 Transkriptmengen der *IAA* und *PIN* Gene



**Abbildung 31: Transkriptlevel von *Aux/IAA* und *PIN* Genen**

Die Transkriptmengen der *Aux/IAA* und *PIN* Gene wird als FPKM für die GFP+ bzw. GFP- Zellen aufgetragen. Ein Sternchen markiert eine signifikant (p-Wert  $\leq 0,01$ ) unterschiedliche Expression in den beiden Zelltypen.

## 7.4 Veränderungen in der Chromatinzugänglichkeit

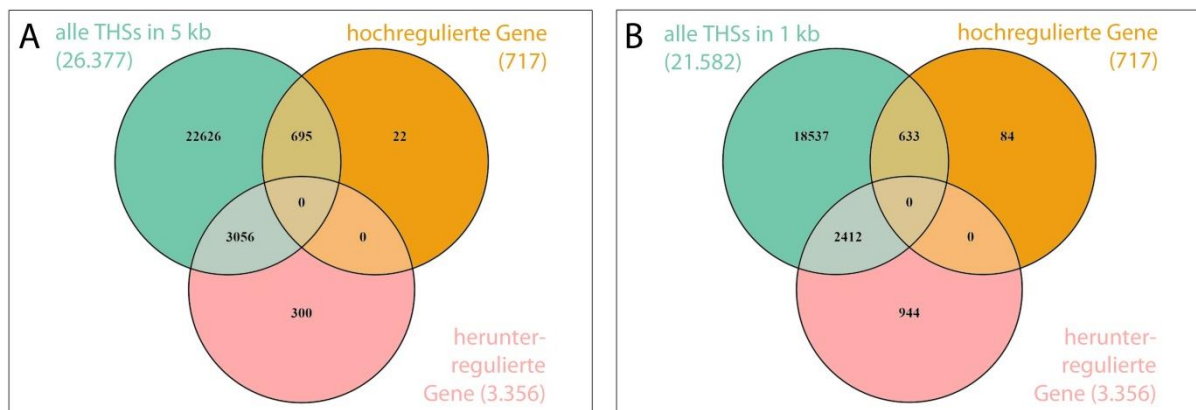


**Abbildung 32: Venn-Diagramm von Genen mit THS sowie AP1 oder SEP3 Bindestelle**

Gene, die AP1 und/oder SEP3 Bindestellen (BSs) nach acht Tagen Dexamethason-Applikation auf *AP1::AP1-GR ap1cal* Infloreszenzen aufweisen, besitzen häufig auch mindestens eine THS in einer Entfernung von 5 kb (A) bzw. 1 kb (B). Diese Korrelation lässt sich auch schon nach zwei Tagen Dexamethason-Applikation für Gene mit THS innerhalb eines Abstands von 5 kb (C) bzw. 1 kb (D) feststellen.



## 7.5 Korrelation von Veränderungen in der Genexpression mit der Chromatinzugänglichkeit



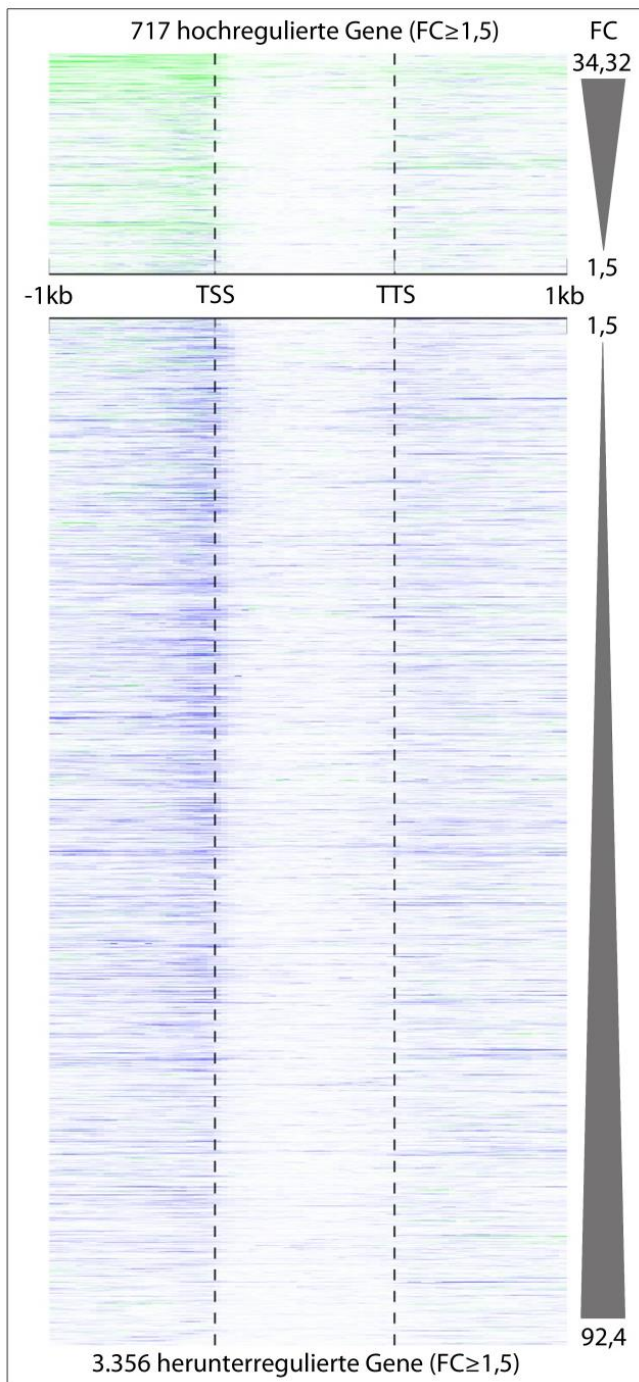
**Abbildung 33: Venn-Diagramm von THS-Genen im Vergleich zu differenziell transkribierten Genen**

Die mittels RNA-Seq identifizierten hoch- bzw. herunterregulierten Gene des direkten Vergleichs von GFP+ und GFP- Zellen weisen häufig auch mindestens eine THS in einer Entfernung von 5 kb (A) bzw. 1 kb (B) zum Gen auf.

**Tabelle 8: Anteil an transkribierten bzw. nicht transkribierten Genen bei denen THSs identifiziert werden konnten**

Nukleare Gene in GFP+ und GFP- Zellen mit einem FPKM  $\geq 1$  gelten als transkribiert und mit einem FPKM  $< 1$  als nicht transkribiert. Die Anzahl bzw. der prozentuale Anteil aller Gene, die exprimiert oder nicht exprimiert werden und bei denen im OLR sowie 5 kb bzw. 1 kb stromauf- und -abwärts mindestens eine THS identifiziert wurde, ist hier aufgelistet.

	Alle Gene	Gene mit THSs in 5 kb	Gene mit THSs in 5 kb [%]	Gene mit THSs in 1 kb	Gene mit THSs in 1 kb [%]
<b>GFP+ (FPKM <math>\geq 1</math>)</b>	22.985	21.493	93,5	18.204	79,2
<b>GFP+ (FPKM <math>&lt; 1</math>)</b>	10.294	4.502	43,7	2.532	24,6
<b>GFP- (FPKM <math>\geq 1</math>)</b>	24.777	22.730	91,7	19.097	77,1
<b>GFP- (FPKM <math>&lt; 1</math>)</b>	8.502	3.441	40,5	2.001	23,5



**Abbildung 34: Heatmap der Chromatinzugänglichkeit der hoch- und herunterregulierten Gene**

Die Zugänglichkeit des Chromatins wurde im transkribierten Bereich des jeweiligen Gens sowie in den Regionen 1kb vor dem TSS bzw. nach dem TTS aufgetragen. Die Gene wurden nach ihrem FC sortiert. Eine erhöhte, aber nicht zwingend signifikante Chromatinzugänglichkeit ist in GFP+ Zellen in grün bzw. in GFP- Zellen in blau dargestellt. Der Grad an Zugänglichkeit wird durch die Farbhelligkeit wiedergegeben.

## **8 Anhang B**

### **8.1 DNA-Sequenzen**

### **8.2 Gene mit THS bzw. dTHS in Korrelation zu Hoch-, Herunterregulation, AP1 bzw. SEP3 Bindestellen**

Gene mit THS im transkribierten Bereich sowie 5 kb bzw. 1 kb stromauf- und –abwärts sowie dTHS+ und dTHS– können mit einem FC  $\geq 1,5$  sowie p-Wert  $\leq 0,01$  hoch- bzw. herunterreguliert (+) werden sowie mit AP1 oder SEP3 Bindestellen (Pajoro et al., 2014) korrelieren (+).

## Erklärung

Ich versichere, dass ich die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von unten angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie, dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Prof. Dr. Wolfgang Werr betreut worden.

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

Teilpublikation:

Anneke Frerichs, Rahere Thoma, Ali Taleb Abdallah, Peter Frommolt, Wolfgang Werr, John William Chandler, 2016. The founder-cell transcriptome in the Arabidopsis apetala1 cauliflower inflorescence meristem. BMC Genomics 17:855

